



Unidad Funcional de Investigación de Enfermedades Crónicas
Unidad de Neuro-Inflamación



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Caracterización de células mieloides cerebrales y sus alteraciones en un modelo murino de envejecimiento

Tesis Doctoral

Elena Quintana Menéndez

Licenciada en Biología, especialidad en Neurobiología

Bajo la dirección:

Dra. Eva M^a. Cano López

Dra. Silvia M. Arribas Rodríguez

Madrid, 2017

Las doctoras: **Eva María Cano López**, Científico Titular de OPI en la Unidad Funcional de Investigaciones en Enfermedades Crónicas del Instituto de Salud Carlos III (ISC III) y **Silvia M. Arribas Rodríguez**, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN

Que Doña Elena Quintana Menéndez, Licenciada en Biología, especialidad de Neurobiología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Caracterización de células mieloides cerebrales y sus alteraciones en un modelo murino de envejecimiento”, presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Revisado el presente trabajo, expresamos nuestra conformidad para la presentación del mismo en el departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometidos a evaluación ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid a 22 de mayo de 2017.

Dra Eva M^a Cano López
Científico Titular, ISCIII

Dra Silvia M. Arribas Rodríguez
Profesora Titular, UAM

**“Procuremos agradar e instruir;
nunca asombrar.”**

Don. Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

No puedo dejar pasar la oportunidad de expresar mi total agradecimiento a todas las personas que me han apoyado, orientado y me han insuflado los ánimos suficientes para poder continuar con el desarrollo del presente trabajo, tan arduo y lleno de dificultades.

Hay dos pilares, sin los cuales no habría podido realizar esta tesis:

Uno de estos pilares son mis directoras de tesis, la Dra. Eva M^a. Cano López y la Dra. Silvia M. Arribas Rodríguez, a las que quiero mostrarles mi agradecimiento, no solo por el afecto que he recibido o el conocimiento que he adquirido sino también porque gracias a ellas aprendí a ser autodidacta y autosuficiente, cualidad que me puede ser de gran utilidad en mi posterior desarrollo profesional.

Quiero agradecerle a mis compañeros de laboratorio Nando, Andrés y Patri por la paciencia que tuvieron conmigo. Y a la Dra. Eva, que me acogió y no dejó de luchar para sacar lo mejor de mí hasta concluir este trabajo. Estarán siempre en mis recuerdos.

Gracias a todo el personal del Instituto de Salud Carlos III (ISC III) con los que, de alguna forma, tuve relación pues todos me dieron una acogida excepcional. Además, en la Unidad Funcional de Investigaciones en Enfermedades Crónicas del Instituto de Salud Carlos III (ISC III) me encontré con profesionales dispuestos a echarme una mano cuando me veían un poco atascada. No puedo olvidarme del Dr. Marçal Vilar, Dra. Helena Mira, Dra. Isabel Liste, Dra. Sonsoles Hortelano, Dra. Marta Gallego, Dr. Alberto Zambrano y el Dr. Calero y su grupo por resolver algunas dudas y cuestiones que se me plantearon en la realización de esta tesis. Tampoco puedo olvidar la ayuda indispensable que me prestaron los técnicos Raquel y Rafa, siempre con la mejor disposición.

En este arduo camino tuve la suerte de tropezarme con el Dr. Juan Carlos Leza que me dispensó un trato exquisito y con el Dr. Jorge Árias, cuyos consejos y enseñanzas fueron de gran utilidad. Mi más sincero agradecimiento.

No puedo olvidarme de mis profesores en la UCM, Dr. Benjamín Fernández Ruiz, Dr. Antonio Tormo, Dr. Íñigo Azcoitia Elías, Dra. Isabel Corpas Vázquez, Dra. Ana Isabel Valenciano,... y un elenco de magníficos profesionales que supieron darme los conocimientos necesarios para acometer esta Tesis, y en especial mi profesora de Neuroquímica la Dra.

María Luisa Leret Verdú, con ella realicé los primeros “pinitos” en la investigación y fue la primera en enseñarme la pasión por la investigación. A todos ellos, gracias.

Gracias a todos mis amigos, los tuve abandonados y no les pude dedicar todo el tiempo que se merecían durante este periodo y, aun así, no dejaron de animarme. No puedo olvidarme de mi amigo el Dr. Eduardo García Laredo, gracias por tu ayuda y ánimos constantes que me ayudaron a reforzar mi autoestima en los momentos más difíciles. Tenías razón, “si se quiere, se puede”.

El otro pilar, han sido mis padres. Siempre han estado ahí cuando los he necesitado y en momentos de penumbra y apatía me han proporcionado la luz y el ánimo suficiente para poder continuar. Nunca perdieron la fe en mí y de ellos aprendí que todo, aun no siendo agradable, tiene su parte positiva.

Aunque yo firme esta Tesis Doctoral a todos, en mayor o menor medida, os pertenece.

RESUMEN

Las células mieloides, en el sistema nervioso central (SNC), constituyen una clase heterogénea de células del sistema inmune innato que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis en los tejidos durante el desarrollo y la edad adulta. El aislamiento y caracterización de las diferentes subpoblaciones de células mieloides en el cerebro sano de ratones adultos, resulta clave para entender su papel en muchos procesos con perfil inflamatorio. Para ello, nos hemos servido de ratones transgénicos *Csf1r-EGFP* y *Clec9a^{egfp/egfp}*, que nos permiten visualizar las distintas subpoblaciones de células mieloides y realizar un seguimiento adecuado de su purificación, seguido de la caracterización de las células con marcadores específicos, mediante análisis por citometría de flujo, así como la caracterización de las distintas subpoblaciones en el cerebro tras el tratamiento con Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3), una citoquina implicada en la homeostasis de las células dendríticas (DCs), las principales células presentadoras de antígeno.

Dentro de los receptores de lectina tipo C, el DNGR-1 (CLEC9A) es un marcador específico de DCs con funciones similares aunque localizaciones distintas: las DCs CD8 α ⁺ en tejidos linfoides y las DCs CD103⁺CD11b^{low} en tejidos periféricos. DNGR-1 se expresa principalmente en las meninges y en los plexos coroideos y su expresión en cerebro se ve aumentada en presencia de Flt3L. La mayoría de estas células expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Además, se detectó un incremento de marcadores específicos de DC de bazo CD8 α ⁺, como Batf-3 e Irf-8, pero no de moléculas co-estimuladoras como Cd80 y Cd86, indicando un fenotipo inmaduro de este tipo celular. La presencia de DNGR-1 en cerebro constituye por tanto, un marcador específico de una subpoblación de DCs implicadas en el reconocimiento de células muertas y en la presentación cruzada a linfocitos T CD8⁺.

A continuación, nos hemos centrado en la cada vez más estrecha relación entre el sistema inmune y el envejecimiento; en especial, en el papel de los macrófagos del parénquima cerebral (microglía). La microglía constituye la primera línea de defensa que responde a cualquier tipo de daño, coordinando la respuesta innata y adaptativa. Sin embargo, no se conoce completamente su papel en condiciones de envejecimiento normal y patológico. En animales jóvenes y sanos, usando el marcador Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), se observa que la microglía suele presentar una morfología ramificada, con procesos largos y finos y una distribución homogénea por todo el cerebro, sin solaparse los procesos entre ellos. Ante un daño o lesión (como lesión mecánica), la microglía cambia de morfología de

forma drástica, engrosándose el citoplasma y acortándose los procesos, adquiriendo mucha mayor expresión de este marcador. Esta respuesta, durante mucho tiempo, ha sido definida como “activación de microglía”. Hasta ahora, el consenso general sobre la microglía en el envejecimiento era la presencia de cambios fenotípicos compatibles con el aumento de su estado de activación. No obstante, todavía no está del todo claro si la neurodegeneración puede ser debida a un funcionamiento erróneo de las células cerebrales envejecidas o a una acumulación de daños con la edad.

Para ello, se utilizó un modelo animal de envejecimiento acelerado, los SAM (senescence-accelerated prone mouse) y en concreto la cepa SAM P8, comparándolo con ratones de su mismo fondo genético pero con un envejecimiento normal, los SAM R1. Todos los ratones mostraron un ligero aumento de las células Iba-1⁺ con la edad; sin embargo, el número de células permaneció estable, a tenor de los niveles de expresión génica mantenidos de Cx3cr1, indicando cierto aumento de la señalización de Iba-1⁺. Los ratones SAM P8 mostraron un número significativamente menor de Iba-1⁺ a los 2 meses (m) en hipocampo, una región clave en el envejecimiento. Por los motivos que sean, en SAM P8 hubo menor expresión de este marcador, como si fuera defectivo en Iba-1, independientemente de si esa microglía fuera reactiva o activada. Al analizar el perfil de citoquinas proinflamatorias de la microglía aislada de parénquima cerebral, se detectó un aumento de TNF- α , IL-6, IL-1 β y CCL-2 en P8 sobre los R1 desde los 2 m. Este estado de sensibilización de la microglía de parénquima cerebral no se acompañó de co-localización con MHC II⁺. En cambio, sí se registró expresión de microglía Iba-1⁺-MHC II⁺ en los plexos coroideos, una región con un papel crítico para orquestar los pasos iniciales de la inflamación en el SNC. En los SAM P8, las células Iba-1⁺-MHC II⁺ aumentó con la edad pero era una población menor que en controles CD1-ICR de las mismas edades, señalando quizás, un papel defectivo en la respuesta inflamatoria. Otros de los cambios llamativos con la edad ha sido lo que se denomina como “microglía distrófica”. La microglía en el hipocampo de los SAM P8 y animales envejecidos se observó desramificada, con procesos tortuosos y citoplasma fragmentado. Al analizar marcadores de daño celular como γ H2AX, apareció dañada en algunas regiones muy concretas como el hipocampo. Los mecanismos que subyacen en el envejecimiento y cuándo estos pueden resultar protectores/deletéreos, será la clave de la forma de diseñar nuevas estrategias a la hora de atajar muchos de los trastornos con un perfil neuroinflamatorio.

ÍNDICE

| | |
|--|---------------|
| INTRODUCCIÓN | - 17 - |
| CÉLULAS MIELOIDES DEL CEREBRO Y NEUROINFLAMACIÓN | - 19 - |
| 1. <i>Células del Sistema Nervioso Central</i> | - 19 - |
| 2. <i>Clasificación de la neuroglía</i> | - 20 - |
| 3. <i>Células mieloides del cerebro</i> | - 22 - |
| 3.1. <i>La microglía</i> | - 22 - |
| 3.2. <i>Otros macrófagos cerebrales</i> | - 24 - |
| 3.3. <i>Células dendríticas cerebrales</i> | - 25 - |
| 4. <i>Sistema nervioso: ¿un órgano inmunoprivilegiado?</i> | - 28 - |
| 5. <i>La respuesta inflamatoria estéril</i> | - 29 - |
| PAPEL DE LAS CÉLULAS MIELOIDES CEREBRALES EN EL ENVEJECIMIENTO | - 32 - |
| 1. <i>Envejecimiento fisiológico</i> | - 32 - |
| 2. <i>Papel de la inflamación en el envejecimiento del cerebro</i> | - 32 - |
| 3. <i>La microglía en el envejecimiento</i> | - 33 - |
| 3.1. <i>Cambios morfológicos y en densidad de la microglía asociados a envejecimiento</i> | - 33 - |
| 3.2. <i>Cambios funcionales de la microglía asociados a envejecimiento</i> | - 36 - |
| 4. <i>Células inmunes en el cerebro envejecido</i> | - 39 - |
| 5. <i>Modelos animales de envejecimiento: SAM P8</i> | - 40 - |
| 5.1. <i>Características generales de los SAM P8</i> | - 41 - |
| 5.2. <i>SAM P8 como modelo de Enfermedad de Alzheimer asociada a envejecimiento</i> | - 42 - |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | - 45 - |
| MATERIALES Y MÉTODOS | - 49 - |
| ANIMALES | - 51 - |
| 1. <i>Líneas transgénicas</i> | - 51 - |
| 1.1. <i>Ratones c-fms-EGFP (Csf1r-EGFP): B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP) 1Hume/J</i> | - 51 - |
| 1.2. <i>Ratones CX3CR1-GFP: B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J</i> | - 51 - |
| 1.3. <i>Ratones Clec9a^{egfp/egfp} (deficientes en DNGR-1)</i> | - 51 - |
| 2. <i>Líneas no transgénicas</i> | - 52 - |
| 2.1. <i>Ratones SAM P8 y R1</i> | - 52 - |
| 2.2. <i>Ratones CD1-ICR y C57/BL6</i> | - 52 - |
| 3. <i>Tratamientos de los animales</i> | - 53 - |
| 3.1. <i>Tratamiento con Flt3L</i> | - 53 - |
| AISLAMIENTO DE CÉLULAS MIELOIDES DE CEREBRO ADULTO | - 53 - |
| CITOMETRÍA DE FLUJO | - 55 - |
| TÉCNICAS HISTOLÓGICAS | - 56 - |
| 1. <i>Fijación</i> | - 56 - |
| 2. <i>Post-fijación</i> | - 56 - |
| 3. <i>Procesamiento del tejido</i> | - 56 - |
| 3.1. <i>Material procesado para criostato</i> | - 56 - |
| 3.2. <i>Material procesado para vibratomo</i> | - 57 - |
| 4. <i>Tinciones generales</i> | - 57 - |
| 4.1. <i>Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)</i> | - 57 - |
| 5. <i>Inmunofluorescencia</i> | - 58 - |
| 6. <i>Histoquímica</i> | - 60 - |
| 6.1. <i>Reacción enzimática de la β-galactosidasa asociada a la senescencia</i> | - 60 - |
| 6.2. <i>Tinción de ácido peryódico de Schiff o leucofucsina (PAS) con hematoxilina</i> | - 61 - |
| 6.3. <i>Tinción de Giemsa</i> | - 62 - |
| 7. <i>Inmunohistoquímica</i> | - 63 - |
| ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA | - 63 - |
| 1. <i>Extracción de RNA total</i> | - 63 - |
| 2. <i>Cuantificación relativa por PCR cuantitativa (RT-qPCR)</i> | - 64 - |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | - 66 - |
| OBTENCIÓN DE IMÁGENES | - 67 - |
| 1. <i>Microscopio óptico</i> | - 67 - |
| 2. <i>Microscopía Confocal</i> | - 67 - |
| 2.1. <i>Mapas del cerebro (imágenes solapadas)</i> | - 67 - |

| | | |
|---|---|----------------|
| 2.2 | Imágenes estándar | - 68 - |
| ANÁLISIS DE IMÁGENES | | - 68 - |
| 1. | <i>Esterología en regiones de hipocampo</i> | - 68 - |
| 3. | <i>Evaluación de la morfología</i> | - 70 - |
| 3.1 | Caracterización visual manual | - 70 - |
| 3.2. | Análisis de Sholl aplicado a la microglía..... | - 72 - |
| RESULTADOS | | - 73 - |
| AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES EN EL CEREBRO SANO | | - 75 - |
| 1. | <i>Visualización de células mieloides en parénquima cerebral, meninges y plexos coroideos</i> | - 75 - |
| 1.1. | Expresión de células CSF1R-EGFP positivas en el cerebro de ratón sano | - 75 - |
| 1.2. | Expresión de Iba-1 en el cerebro | - 83 - |
| 2. | <i>Aislamiento y caracterización de células mieloides del cerebro de ratón adulto</i> | - 85 - |
| 2.1. | Aislamiento de células de cerebro CSFR1-EGFP positivas | - 85 - |
| 2.2. | Caracterización de células CD45 positivas en el parénquima cerebral..... | - 88 - |
| 2.3. | Caracterización de células CD45 positivas en las membranas menínges y plexos coroideos | - 90 - |
| 2.4. | Análisis de células CD11c positivas en cerebro de ratón en homeostasis | - 91 - |
| 2.5. | Análisis de la expresión del MHC II en el cerebro sano de ratón | - 92 - |
| 3. | <i>Caracterización de células DNDR-1/CLEC9A positivas en cerebro de ratón adulto en homeostasis</i> | - 96 - |
| 3.1- | Expresión de transcritos Dngr-1/Clec9a en el cerebro del ratón | - 96 - |
| CAMBIOS ASOCIADOS A EDAD EN EL ENVEJECIMIENTO NORMAL Y PATOLÓGICO | | - 101 - |
| 1. | <i>Cambios asociados a edad en hipocampo</i> | - 102 - |
| 1.1. | Gránulos de PAS asociado al envejecimiento y procesos patológicos en hipocampo | - 102 - |
| 1.2. | Cambios en la densidad de microglía asociado a edad y envejecimiento en hipocampo | - 104 - |
| 2. | <i>Análisis de microglía hipertrófica y clústeres en ratones SAM P8</i> | - 108 - |
| 3. | <i>Análisis de microglía senescente en el SAM P8</i> | - 110 - |
| 4. | <i>Evaluación funcional de las células de microglía en el modelo de envejecimiento SAM P8</i> | - 113 - |
| 4.1. | Evaluación de células presentadoras de antígeno (MHC II ⁺) en el modelo de envejecimiento SAM P8..... | - 113 - |
| 4.2. | Análisis de citoquinas inflamatorias en el modelo SAM P8 asociadas a envejecimiento | - 115 - |
| 5. | <i>Evaluación de la morfología</i> | - 117 - |
| 5.1. | Caracterización visual manual | - 117 - |
| 5.2. | Análisis de Sholl | - 120 - |
| DISCUSIÓN..... | | - 123 - |
| AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES CEREBRALES EN EL CEREBRO ADULTO DE RATÓN EN HOMEOSTASIS | | - 125 - |
| ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN DENSIDAD, MORFOLÓGICOS Y DE MARCADORES DE LOS MACRÓFAGOS DE PARÉNQUIMA EN EL ENVEJECIMIENTO NORMAL Y EN EL MODELO DE ENVEJECIMIENTO | | - 130 - |
| 1. | <i>Acúmulos de PAS asociado con la edad</i> | - 130 - |
| 2. | <i>Cambios en la densidad de microglía asociado con la edad</i> | - 131 - |
| 3. | <i>Acúmulos de clústeres de células hipertróficas en ratones P8</i> | - 134 - |
| 4. | <i>Senescencia asociada a envejecimiento</i> | - 137 - |
| 5. | <i>No co-localización de x-gal y microglía</i> | - 137 - |
| 6. | <i>Co-localización de γH2A en microglía</i> | - 137 - |
| 7. | <i>Aumento de Iba-1-MHC II⁺ en plexos coroideos con la edad</i> | - 138 - |
| 8. | <i>Expresión de citoquinas con la edad</i> | - 140 - |
| CONCLUSIONES..... | | - 145 - |
| BIBLIOGRAFÍA..... | | - 149 - |
| ANEXO | | - 169 - |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| APC, | Célula presentadoras de antígeno |
| APP, | Proteína precursora de amiloide |
| Aβ, | Proteína beta amiloide |
| AβPP, | Proteína precursora de A β |
| AβPP, | Proteína precursora de A β |
| BATF-3, | Factor de transcripción de cremallera de leucina básico ATF-like 3 |
| bDC, | Célula dendrítica del cerebro |
| BDNF, | Factor neurotrófico derivado del cerebro |
| BHE, | Barrera hematoencefálica |
| BP, | Parénquima cerebral |
| CA, | <i>Cornu ammonis</i> |
| CCL2, | <i>C-C motif chemokine ligand 2</i> |
| cDC, | Célula dendrítica clásica |
| CDP, | Progenitor común de célula dendrítica |
| Ch, | Plexos coroideos |
| CRP, | Proteína C reactiva |
| CSF, | Factor estimulante de colonias |
| CTLD, | Dominio de lectina tipo C |
| CTLR, | <i>C-type Lectin receptor</i> |
| DAB, | 3, 3'-diaminobenzidina |
| DAPI, | 4', 6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato |
| DC, | Células dendrítica |
| DG, | Giro dentado |
| EA, | Enfermedad de Alzheimer |
| EAE, | Encefalomiелitis autoinmune experimental |
| EGFP, | Proteína verde fluorescente mejorada |
| EM, | Esclerosis múltiple |
| EtOH, | Etanol |
| EYFP, | Proteína amarilla fluorescente mejorada |
| FBS, | Suero bobino fetal |
| FC, | Citometría de flujo |
| Flt3, | Tirosina kinasa 3 tipo FMS |
| Flt3L, | Ligando de tirosina kinasa 3 tipo FMS |
| GFAP, | Proteína glial fibrilar ácida |
| H&E, | Hematoxilina y eosina |
| HCd, | Hipocampo dorsal |

| | |
|------------------------------------|---|
| HRP, | Peroxidasa del rábano |
| HSC, | Célula madre hematopoyética |
| i.p., | Intraperitoneal |
| Iba-1, | Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 |
| IF, | Tinción de inmunofluorescencia |
| IFN, | Interferón |
| IL, | Interleuquina |
| IRF-8, | Factor regulador de interferón 8 |
| ITGAE, | Integrina alfa E |
| LOAD, | Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío |
| LPS, | Lipopolisacárido |
| m, | Mes |
| m/Ch, | Membranas menínges y plexos coroideos |
| MDP, | Precursor de célula dendrítica |
| MDSC, | Células supresoras derivadas de mieloides |
| MHC II, | Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II |
| mo, | Estrato molecular |
| NK, | <i>Natural killer</i> |
| NMDA, | N-metil-D-aspartato |
| PAMPs, | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PAS, | Ácido peryódico de Schiff o leucofucsina |
| PB, | Tampón fosfato |
| PBS, | Tampón fosfato salino |
| PBT, | Tampón fosfato salino con 1% Tx-100 |
| pDC, | Célula dendrítica plasmacitoide |
| PFA, | Paraformaldehído |
| po, | Capa polimórfica |
| pre-DC, | Precusores de células dendríticas clásicas |
| ROS, | Especies reactivas de oxígeno |
| RT, | Temperatura ambiente |
| RT-qPCR, | RT-PCR cuantitativa |
| SAM P, | Ratón de senescencia acelerada |
| SAM R, | Ratón resistente a senescencia acelerada |
| SA- β gal, | β -galactosidasa asociada a senescencia |
| SEM, | Error estándar de la media |
| sg, | Capa granular |
| slm, | Estrato lagunoso-molecular |
| SNC, | Sistema Nervioso Central |
| SNP, | Sistema Nervioso Periférico |

| | |
|---------------|--|
| so, | Estrato <i>oriens</i> |
| sp, | Estrato piramidal |
| sr, | Estrato radiado |
| SVZ, | Zona subventricular |
| TGF, | Factor de crecimiento transformante |
| TH, | Tirosina hidroxilasa |
| TLR, | Receptor de tipo Toll |
| Tm, | Temperatura de fusión |
| TNF, | Factor de necrosis tumoral |
| V3, | Tercer ventrículo |
| V4, | Cuarto ventrículo del cerebro |
| VL, | Ventrículos laterales |
| wt, | Cepa de ratón salvaje |
| X-gal, | 5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-galactopiranósido |

INTRODUCCIÓN

Células mieloides del cerebro y neuroinflamación

La neuroinflamación es un proceso complejo que comprende distintas respuestas celulares: activación celular, muerte celular, quimiotaxis, etc. Además, implica distintos tipos celulares: neuronas, astrocitos, microglía, células endoteliales, neutrófilos, monocitos y células T. La relación entre todos estos tipos de células es la responsable del equilibrio necesario para el mantenimiento del tejido sano. La recuperación de este equilibrio es el que determina el tamaño y la evolución del tamaño del daño en respuesta al proceso neuroinflamatorio. Al ser un balance complejo, cualquier desviación tiene consecuencias y puede ser el origen subyacente del por qué, muchas de las terapias diseñadas frente a una diana específica, han fallado en los ensayos clínicos. Enfermedades cerebrales de gran prevalencia en la clínica como son la isquemia cerebral, la esclerosis múltiple, el Parkinson o la enfermedad de Alzheimer (EA) tienen un componente neuroinflamatorio. Por lo tanto, un mayor entendimiento de las células y los procesos implicados tienen gran relevancia en biomedicina.

1. Células del Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central (SNC), está formado por dos tipos de células: la Neurona y la Neuroglía. Las neuronas (del griego νῆρον *neûron*, “cuerda”) son un tipo de células del sistema nervioso cuya principal función es la excitabilidad eléctrica de su membrana plasmática, están especializadas en la recepción de estímulos y la conducción del impulso nervioso. La Neuroglía, células gliales o simplemente glía (del griego, γλία, “pegamento”), constituyen un grupo de células no neuronales muy heterogéneo que mantienen la homeostasis, producen mielina y proporcionan soporte y protección a las neuronas en el sistema nervioso central y periférico (SNP) (Jessen y Mirsky, 1980). Usando técnicas de impregnación de metales de Golgi, Cajal identificó en 1913 tres elementos: neuronas (llamado como primer elemento), astrocitos (segundo elemento) y el tercer elemento (células con núcleo pequeño y redondeado). En 1919, Río-Hortega usó por primera vez el término “microglía” para referirse a este tercer elemento, el cual sugería que se podría transformar por sí misma en células fagocíticas migratorias (Río-Hortega, 1921), revisado en (Ransohoff y Cardona, 2010). El número de células de glía versus neuronas es un tema de debate, muchos artículos originales sugieren la existencia de 100 billones de neuronas y 10 veces más de células gliales (Allen y Barres, 2009; Doetsch, 2003; Kandel *et al.*, 2000; Nishiyama *et al.*, 2005; Noctor *et al.*, 2007; Ullian *et al.*, 2001). Sin embargo, estos datos están siendo actualmente revisados y Suzana Herculano-Houzel *et al* muestran que este porcentaje varía tanto con la especie a estudiar como la estructura cerebral a estudio (Herculano-Houzel, 2009).

Hasta fechas muy recientes, las neuronas eran consideradas las unidades funcionales básicas del SNC, mientras que la glía sólo tenía un papel de soporte. Este concepto está cambiando rápidamente. Durante las dos última décadas se han descrito un gran número de funciones de la glía en la fisiología, patología y organización del desarrollo funcional del cerebro (Allen y Barres, 2009; Barres, 2008).

2. Clasificación de la neuroglía

Aunque no hay un término unificado para neuroglía, muchas definiciones existentes enfatizan el rol de soporte de estas células y algunas hacen referencia a sus procesos de ramificación y su delicada morfología. La mayoría de las definiciones tienen en común que considerar la glía como las células residentes del cerebro que no son neuronas eléctricamente excitables o células vasculares. Generalmente, la neuroglía en el SN de mamíferos está subclasificada en glía del SNP y glía del SNC. La glía del SNP incluye: células de Schwann, células satélite gliales, células gliales envainadas olfativas y glía entérica. La glía del SNC generalmente se subdivide en células endoteliales, astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Figura 1). Las células NG2, se consideran un progenitor glial residente tanto en la materia gris como en la blanca del SNC adulto, son precursores de oligodendrocitos y posiblemente astrocitos (Nishiyama *et al.*, 2014).

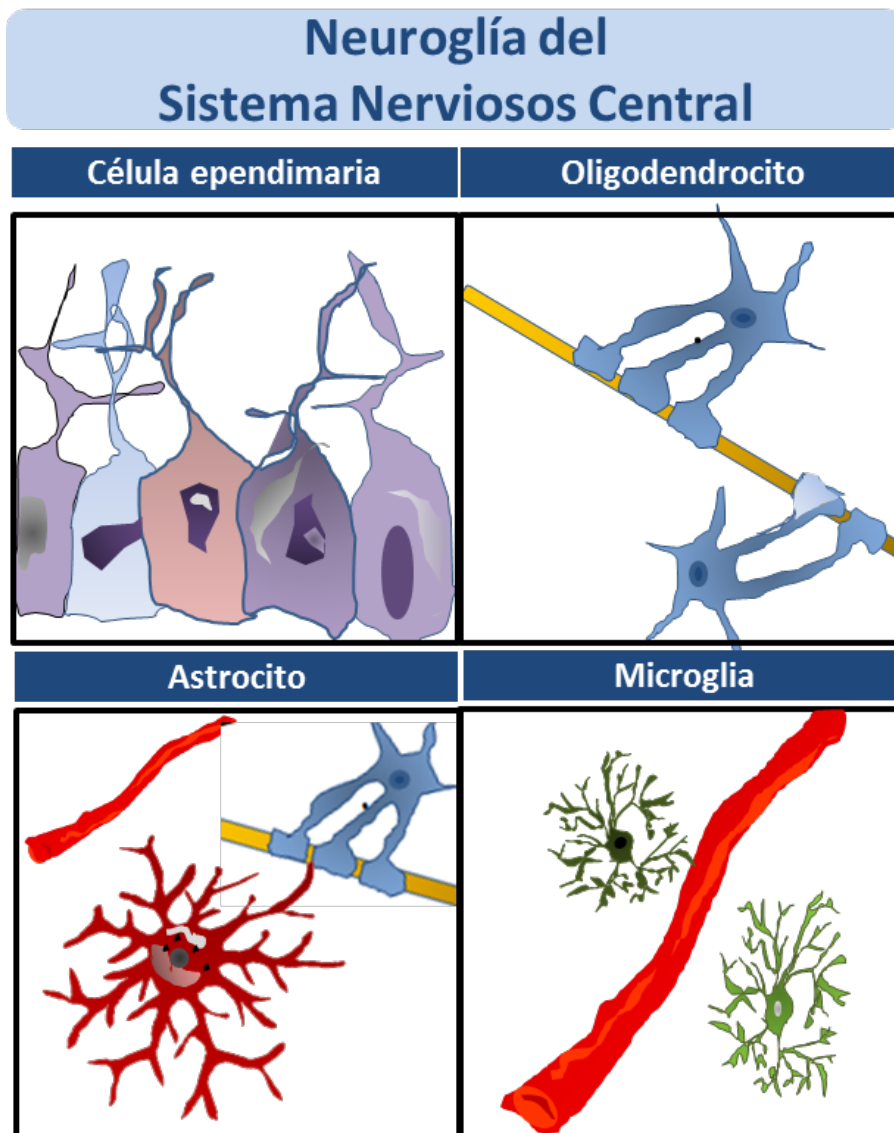


Figura 1. Introducción.- Clasificación de la neuroglía en el SNC. La glía del SNC generalmente se subdivide en células endoteliales, células epiteliales de forma cilíndrica o cuboide que tapizan los ventrículos y el conducto central de la médula espinal, encargadas de la formación y la distribución del líquido cefalorraquídeo; los astrocitos, células ramificadas de diversos tipos con funciones de homeostasis y apoyo metabólico a las neuronas; los oligodendrocitos, son los encargados de la mielinización de fibras y las microglía, encargados de coordinar la respuesta inmune. También se incluyen en ese grupo a las células NG2, consideradas precursores de oligodendrocitos.

Los **astrocitos** son las principales células que mantienen la homeostasis del cerebro. Su nombre hace alusión a su forma “estrellada” aunque en realidad presentan formas muy variadas. Tienen en común la presencia de filamentos intermedios que contienen la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), utilizada como marcador de este tipo celular.

Los **oligodendrocitos** son las células mielinizantes en el SNC y la glía NG2 actúa como precursor de oligodendroglía principalmente.

La **microglía** representa al sistema inmune innato del cerebro. Una célula de microglía es así tanto una célula glial del SNC como un fagocito mononuclear (macrófago), implicado en la respuesta inmune e inflamatoria (Verkhatsky y Butt, 2013) y será descrito en mayor detalle en la sección siguiente.

3. Células mieloides del cerebro

En el sistema nervioso central (SNC), las células mieloides del cerebro engloban distintos tipos de células: origen embrionario, la microglía, (Ginhoux *et al.*, 2010) y las células mieloides de origen periférico que se forman en la médula ósea, y a continuación migran a los tejidos donde se diferencian en macrófagos y células dendríticas (Yona y Jung, 2010). Pertenecen a este último grupo los macrófagos de leptomeninges, perivasculares y de plexos coroideos, con importantes funciones en condiciones fisiológicas normales y procesos patológicos (Ginhoux *et al.*, 2010; Prinz *et al.*, 2017; Prinz y Priller, 2014; Prinz *et al.*, 2011). El papel exacto de estas células en el proceso de envejecimiento normal y patológico no está completamente dilucidado y es el objetivo principal de este trabajo. Los macrófagos del SNC han sido caracterizados y clasificados, principalmente, de acuerdo a su localización, morfología y expresión de marcadores de superficie y respuesta *in vitro*.

3.1. La microglía

El parénquima cerebral (BP del inglés *brain parenchyma*), se considera el tejido cerebral propiamente dicho en el que se excluyen los espacios de fluido cerebroespinal, vasos sanguíneos y envueltas meníngeas.

En el cerebro en homeostasis, la célula mieloide más abundante en el BP es la microglía. Se estima que la microglía constituye alrededor del 5-20% del total de la población glial en el SNC (Gomez-Nicola y Perry, 2015; Kierdorf y Prinz, 2013; Norden y Godbout, 2013; Vinet *et al.*, 2012). Constituye la primera línea de defensa del SNC (Simard y Rivest, 2007) y responde rápidamente a cualquier tipo de daño, actuando como centinelas del SNC y coordinando la respuesta innata y adaptativa. En el cerebro sano, la microglía presentan un pequeño soma con extensas ramificaciones radiales que monitoriza activamente el microambiente (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Estas células se distribuyen a lo largo de todo el cerebro, en estrecha proximidad unas de otras pero sin que exista solapamiento con los procesos de las células vecinas (Graeber y Streit, 2010). Aunque están distribuidas en todo el

cerebro, la densidad y morfología de las misma es específica de cada región y son más abundantes en la materia gris que en la materia blanca (Lawson *et al.*, 1990).

Durante el desarrollo embrionario, todas las células gliales excepto la microglía se originan de la capa ectodérmica del embrión temprano, una de las tres capas germinales primarias. Por el contrario, la microglía tiene un origen mesodérmico y se genera en el saco vitelino durante la embriogénesis en el día embrionario 7.5 (E7.5) en el ratón, cuando las células madre hematopoyéticas en el saco vitelino se convierten en macrófagos primitivos y luego migran al SNC en desarrollo para convertirse en microglía (Aguzzi *et al.*, 2013; Casano y Peri, 2015; Ginhoux y Prinz, 2015). A diferencia de otros macrófagos derivados del saco vitelino, la microglía no se reemplaza durante el período posnatal y el desarrollo posterior por macrófagos derivados del hígado fetal o la médula ósea (Hoeffel *et al.*, 2012). Por ello, la existencia de progenitores locales es foco de gran atención (Ajami *et al.*, 2007).

La microglía históricamente ha dominado el campo de la neuro-inmunología (Ransohoff y Cardona, 2010). Como célula inmune del cerebro, la microglía es la encargada de iniciar la respuesta inflamatoria, caracterizada por la liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias. Por lo tanto, la microglía pertenece al linaje monocito-macrófago y, como tales, juegan papeles centrales para estudiar y regular el microambiente y permitir la homeostasis del tejido cerebral en condiciones normales y patológicas (Prinz y Priller, 2014). Sin embargo, la microglía no son sólo macrófagos cerebrales, como lo demuestran el análisis de las firmas génicas específicas de este tipo celular, sino que indican funciones ontogénicas únicas y diferenciales, que están totalmente adaptadas a su ambiente (Butovsky *et al.*, 2012; Kierdorf y Prinz, 2013; Prinz y Priller, 2014; Schulz *et al.*, 2012). Por lo tanto, a pesar de las semejanzas con otros macrófagos residentes de tejidos periféricos, hay dos propiedades remarcables de la microglía: el origen embrionario restringido y su longevidad (Ginhoux *et al.*, 2010). Esta longevidad de las células de microglía las hace particularmente vulnerables a las agresiones ambientales y en particular al envejecimiento celular.

En principio, la inflamación es una respuesta encargada de proteger al cerebro que tiene que estar finamente regulada; si la resolución de este proceso no es controlado eficientemente, puede resultar dañado el propio tejido. Por este motivo, el papel de la neuroinflamación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas ha sido considerado perjudicial.

3.2. Otros macrófagos cerebrales

Las células mieloides del SNC sano (Figura 2, Introducción) tienen marcadores de superficie, como Iba-1, F4/80, CD11b y el receptor de fractalkina CX3CR1, comunes a la microglía en la mayoría de los casos. Por lo tanto, una manera de distinguirlas está basada en su morfología y distintiva localización y su relación con las células vecinas en diferentes sitios anatómicos del cerebro.

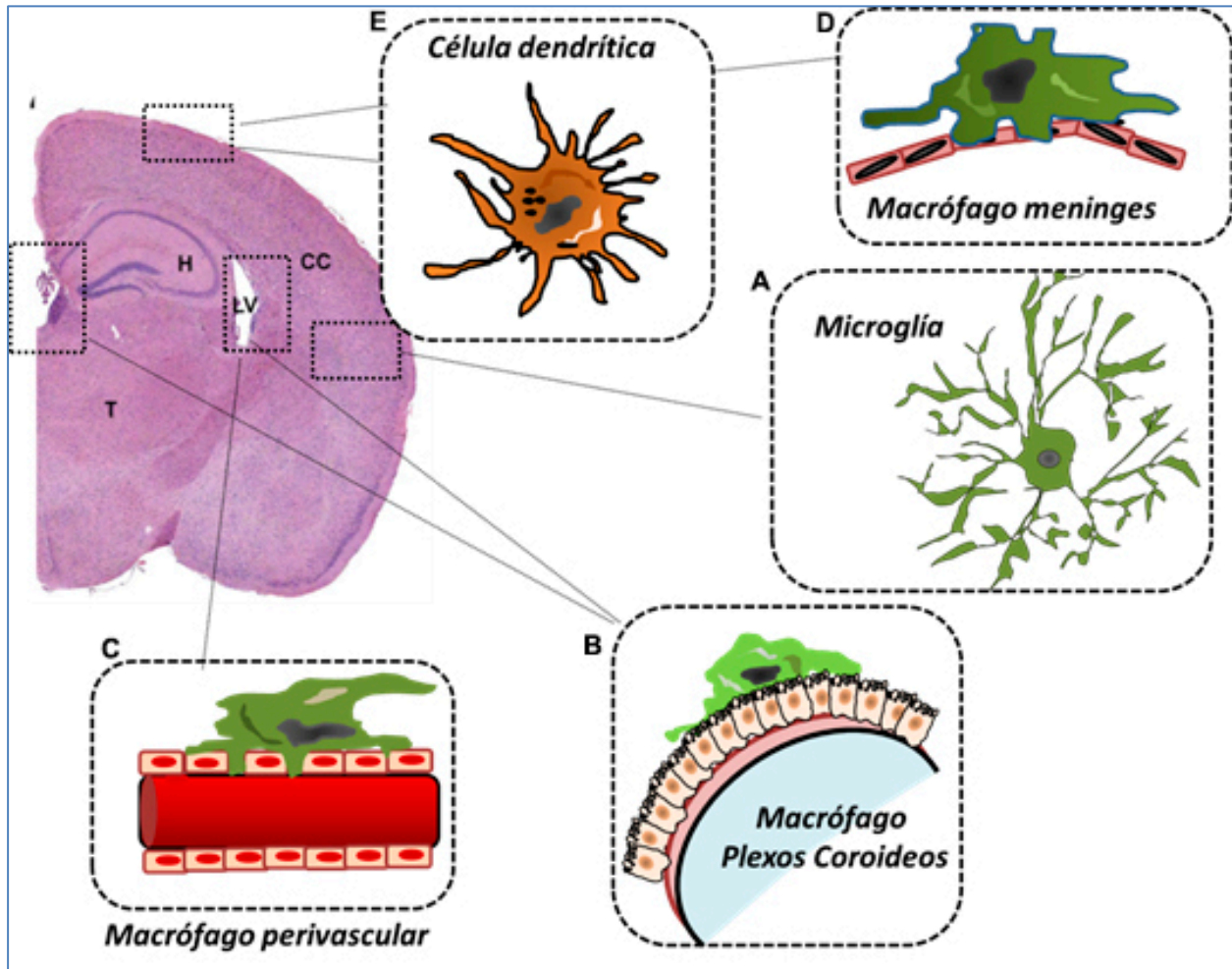


Figura 2. Introducción.- Heterogeneidad de células mieloides en el SNC. Las células mieloides del SNC representan una heterogénea clase de células del sistema inmune innato, que contribuyen al mantenimiento y homeostasis de los tejidos durante el desarrollo y la edad adulta. En condiciones normales, dentro del parénquima se localiza las células de microglía, (A), con procesos pequeños que vigilan activamente el espacio interneuronal en busca de posibles amenazas. Los macrófagos no parenquimales se encuentran en los límites externos del cerebro, como los macrófagos de plexos coroideos (B), perivascuales (C) y de meninges (D). Las células dendríticas derivan de la sangre (E) y se presentan en un bajo número en las mismas localizaciones que los macrófagos. Abreviaturas: H, hipocampo; LV, ventrículo lateral; CC, corteza cerebral; T, tálamo.

Los **macrófagos perivascuales** se encuentran englobados, de interior a exterior, entre células endoteliales laminina positiva y la membrana basal glial (Ransohoff y Cardona, 2010).

Se encuentran en la proximidad de las células endoteliales de los vasos que irrigan el cerebro (Prinz y Priller, 2014).

Los **macrófagos de plexos coroideos**, adyacentes a las células epiteliales o fibroblastos en esas estructuras; se encuentran exclusivamente en el estroma y capa epitelial de los plexos coroideos (Kim *et al.*, 2009).

Los **macrófagos de las meninges**, situados principalmente en la piamadre (subdural), muy próximos a células como fibroblastos ER-TR7⁺ que tapizan meninges y vasculatura meníngea (Prinz y Priller, 2014). La piamadre es la meninge más interna; entre piamadre y aracnoides se localiza el espacio subaracnoideo. Éste contiene una red filamentosa de hebras (trabéculas) de tejido conectivo y está atravesado por numerosas arterias y venas. También contienen líquido cefalorraquídeo (CSF), que es producido por los plexos coroideos dentro de los ventrículos cerebrales. La piamadre está separada del parénquima cerebral por la glía limitante, la capa más externa de tejido neural, la cual constituye una delgada barrera formada por los pies astrocitarios y está asociada con la lámina basal del parénquima que rodea el cerebro y médula espinal (Crossman y Neary, 2007). El aracnoides estructuralmente forma un continuo con la piamadre y juntas, estas membranas forman las leptomeninges (Decimo *et al.*, 2012). Las trabéculas subaracnoideas, las cuales están formadas por tejido conjuntivo que atraviesa el espacio aracnoideo, está adherido a la membrana interna del aracnoides y en íntimo contacto por una lámina de células leptomeníngeas (Weller, 2005). Los vasos sanguíneos dentro del espacio subaracnoideo están contenidos dentro de las trabéculas subaracnoideas. En el lugar donde las trabéculas llega a la piamadre, las capas celulares forma un continuo con la capa externa de la piamadre, la cual está tapizada por una capa de células leptomeníngeas (Dando *et al.*, 2014).

El papel y la caracterización fenotípica de las células mieloides en SNC, en situaciones fisiológicas y de enfermedad están por dilucidar. El aislamiento y diferenciación de estas células ha sido uno de los objetivos prioritarios de esta tesis.

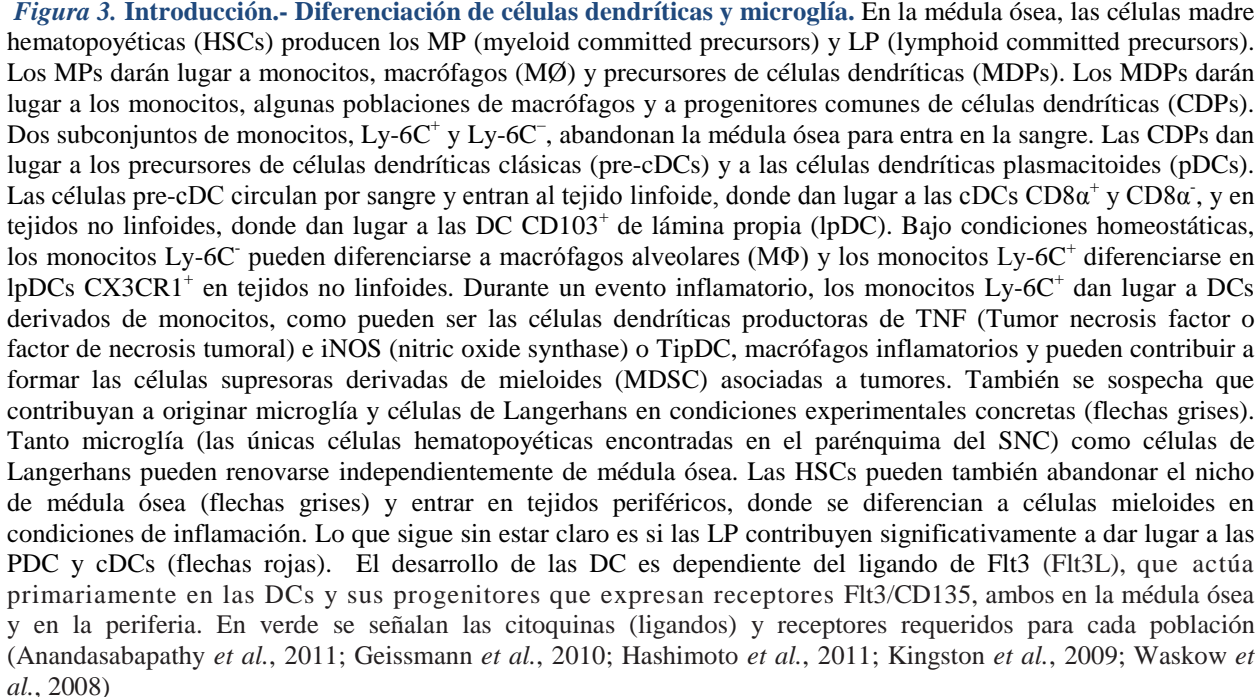
3.3 Células dendríticas cerebrales

La existencia de células dendríticas en el cerebro (bDC) (Figura 3) se ha descrito anteriormente en las membranas meníngeas y los plexos coroideos (m/Ch) en ratas y ratones no lesionados (Matyszak y Perry, 1996; McMenamin, 1999; McMenamin *et al.*, 2003), en el ratón EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) (Fischer y Reichmann, 2001; McMahon

et al., 2005; Serafini *et al.*, 2000) y en la esclerosis múltiple (EM) en el cerebro humano (Prodinger *et al.*, 2011). Los datos recientes, obtenidos mediante el uso de líneas transgénicas de ratón, confirman la existencia de bDC residentes en el cerebro de ratón sano. El marcador de superficie CD11c ha sido utilizado ampliamente como un marcador de célula dendrítica en general. El uso de ratones transgénicos CD11c-GFP (Jung *et al.*, 2002; Prodinger *et al.*, 2011) y CD11c-EYFP (Bulloch *et al.*, 2008) que expresan proteínas fluorescentes en aquellas células que expresan CD11c, ha permitido la detección de estas células en el tejido cerebral. La correspondencia de estas células CD11c⁺ como células dendríticas propiamente dichas pasa por la co-localización con otros marcadores inmunológicos comúnmente asociados con células dendríticas (DCs) y/o microglía/macrófagos (D'Agostino *et al.*, 2012) (Axtell y Steinman, 2009).

En la periferia, las DCs son las células presentadoras de antígeno (APC) que median la inmunidad de las células T y su tolerancia. La red de DCs es compleja y comprende varios subconjuntos de DCs; se ha demostrado que el desarrollo de DCs depende del ligando de tirosina quinasa 3 de tipo fms (Flt3L) (Heath y Carbone, 2009; Watowich y Liu, 2010).

En el cerebro sano, se han descrito la existencia de al menos dos poblaciones de DCs. Por un lado, las células dendríticas del parénquima, que llamaremos bDCs: estas células se describieron mediante el uso del ratón transgénico (CD11c/EYFPTg) que expresa la proteína fluorescente (EYFP) dirigida por el promotor del marcador de DC CD11c (Bulloch *et al.*, 2008). Se ha demostrado que estas células habitan en el cerebro sano y se acumulan en las zonas dañadas en respuesta al daño por isquemia/reperfusión. El otro tipo de DCs descritas, se localizan en la zona de las meninges y el plexo coroideo (m/Ch DC) y proceden de progenitores pre-DC procedentes de la médula ósea. La población de DCs que se encuentra en la barrera m/Ch son dependientes de Flt3L y similares al subgrupo CD8 α ⁺ de DCs convencionales de bazo (Anandasabapathy *et al.*, 2011). Actualmente, es necesario invertir más esfuerzos en la caracterización de la presencia de los distintos tipos de bDCs en el cerebro sano como en el patológico.



4. Sistema nervioso: ¿un órgano inmunoprivilegiado?

El concepto de “inmunoprivilegiado” quizás se encuentre entre los términos más frecuentemente malinterpretados. Numerosos trabajos hacen referencia al cerebro como un órgano inmune privilegiado que no permite la entrada de leucocitos (Greter *et al.*, 2015). Esto ignora, no solo el origen del término “inmunoprivilegiado”, definido por Billingham y Boswell (1953), como la tolerancia relativa a trasplantes, pero también por el hecho de que la BHE (barrera hematoencefálica) fue originalmente descrita como un obstáculo para las moléculas hidrofílicas a nivel de capilares, no para leucocitos, los cuales, de acuerdo con el conocimiento actual, se sabe que abandonan el torrente circulatorio a nivel de vénulas post-capilares (Bechmann *et al.*, 2007; Galea *et al.*, 2006). Como hemos descrito anteriormente, las células mieloides cerebrales comprenden células de microglía, macrófagos perivascuales, menígeos y de plexos coroideos, además de monocitos derivados de la periferia y células dendríticas cerebrales. Por lo tanto, el estado inmunológico privilegiado del cerebro ha recibido atención renovada en los últimos años (Galea *et al.*, 2006) y hoy en día se cree que las células inmunes contribuyen a la fisiología del cerebro sano y a sus diferentes patologías.

Un foco de interés es el tráfico de leucocitos y monocitos a través de la barrera del plexo meníngeo y coroideo (m/Ch) para patrullar el cerebro sano y/o contribuir a la reparación después de la lesión estéril o no estéril del SNC, (Ajami *et al.*, 2007; Ransohoff y Cardona, 2010; Shechter *et al.*, 2013). En la entrada de leucocitos, existen dos pasos diferencialmente regulados y necesarios para llegar al parénquima propiamente dicho (Bechmann *et al.*, 2007; Engelhardt y Coisne, 2011; Owens *et al.*, 2008): los leucocitos, una vez pasada la barrera vascular y la membrana basal vascular, no entran primeramente en el parénquima, sino que se mantienen en los espacios perivascuales, que están separados del neuropilo por una membrana basal adicional y los pies astrocitarios y microglía que forman la glía limitante (Bechmann *et al.*, 2001b; Lassmann *et al.*, 1991; Prodinger *et al.*, 2011). Para atravesar esta membrana y los pies astrocitarios, requiere la inducción de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz 2 y 9 (MMP2 y MMP9, respectivamente), las cuales específicamente fragmentan la conexión entre pies astrocitarios y membrana basal (Agrawal *et al.*, 2006; Sixt *et al.*, 2001; Toft-Hansen *et al.*, 2006). Se ha demostrado el recambio fisiológico de macrófagos perivascuales procedentes de la médula ósea (Bechmann *et al.*, 2001b; Bechmann *et al.*, 2001a). La progresión de monocitos derivados de la sangre a través de la glía limitante es dependiente de señales celulares adicionales como la liberación de ligando de citoquina 2 (C-C motif chemokine ligand 2 o CCL2). Así, los macrófagos perivascuales parecen tener una función de inmunovigilancia a nivel fisiológico. Esto implica que la BHE en esencia es una

barrera de capilar endotelial para solutos y no una barrera estricta para células inmunes. Por tanto, el término “unidad neurovascular” (NVU) (Zlokovic, 2008) se ha introducido en el campo, referido a las células y barreras estructurales más allá del endotelio, incluyendo pericitos, membranas basales vasculares, parenquimales y la glía limitante (Muldoon *et al.*, 2013)

5. La respuesta inflamatoria estéril

La inflamación es un proceso fisiológico que puede ser desencadenado por una variedad de estímulos incluyendo patógenos, tales como bacterias, hongos, parásitos y virus (Nayak *et al.*, 2014). Sin embargo, los patógenos entran muy raramente en el parénquima cerebral gracias a la existencia de la BHE, una membrana semipermeable altamente selectiva formada por células endoteliales y pies astrocitarios, que separa la sangre circulante del parénquima cerebral. Por lo tanto, la inflamación es más comúnmente inducida por otros factores desencadenantes como lesión cerebral, proteínas asociadas a la enfermedad, toxinas ambientales y muerte no controlada (Block y Hong, 2005). En el cerebro, la muerte celular a consecuencia de un daño crea un ambiente proinflamatorio que inicialmente no incluye una inflamación relacionada con patógenos. Este tipo de respuesta inflamatoria se conoce como inflamación estéril (Chen y Nunez, 2010). Numerosos estudios han correlacionado la existencia de neuroinflamación con distintos procesos neurodegenerativos en los que la edad y por lo tanto el envejecimiento, es el factor de riesgo más importante (Klegeris *et al.*, 2007; Wilms *et al.*, 2007). La existencia de distintos tipos de células mieloides en el cerebro, y en especial de bDCs, nos hizo estudiar la existencia y su papel en el cerebro de ratones adultos.

Como hemos mencionado anteriormente, las DCs son consideradas APC profesionales. Aunque forman parte de la inmunidad innata, son capaces de fagocitar patógenos y su función principal es la de procesar material antigénico, devolverlo a su superficie y presentarlo a las células especializadas del sistema inmunitario adaptativo.

Las DCs procesan antígenos procedentes de patógenos (Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), o de *missing-self* (Damage associated molecular pattern molecules (DAMPs)) que son reconocidos a través de receptores especializados que incluyen los receptores de tipo Toll (Toll-like), *scavenger*, manosa y de lectina tipo C (Figura 4).

La mayoría de los receptores fagocíticos que se expresan en macrófagos periféricos han sido descritos también en microglía: receptores Fc, de complemento, miembros de las clases A y B de receptores *scavenger*, receptores de manosa, etc. Debido a la existencia de

INTRODUCCIÓN

células dendríticas en respuesta al daño, nuestra hipótesis ha sido la de estudiar qué miembros específicos de la familia de receptores *C-Type lectin receptor* (receptores de lectina tipo C) están presentes en el cerebro y que a su vez, puedan estar implicados en la respuesta inmune en enfermedades neurodegenerativas.

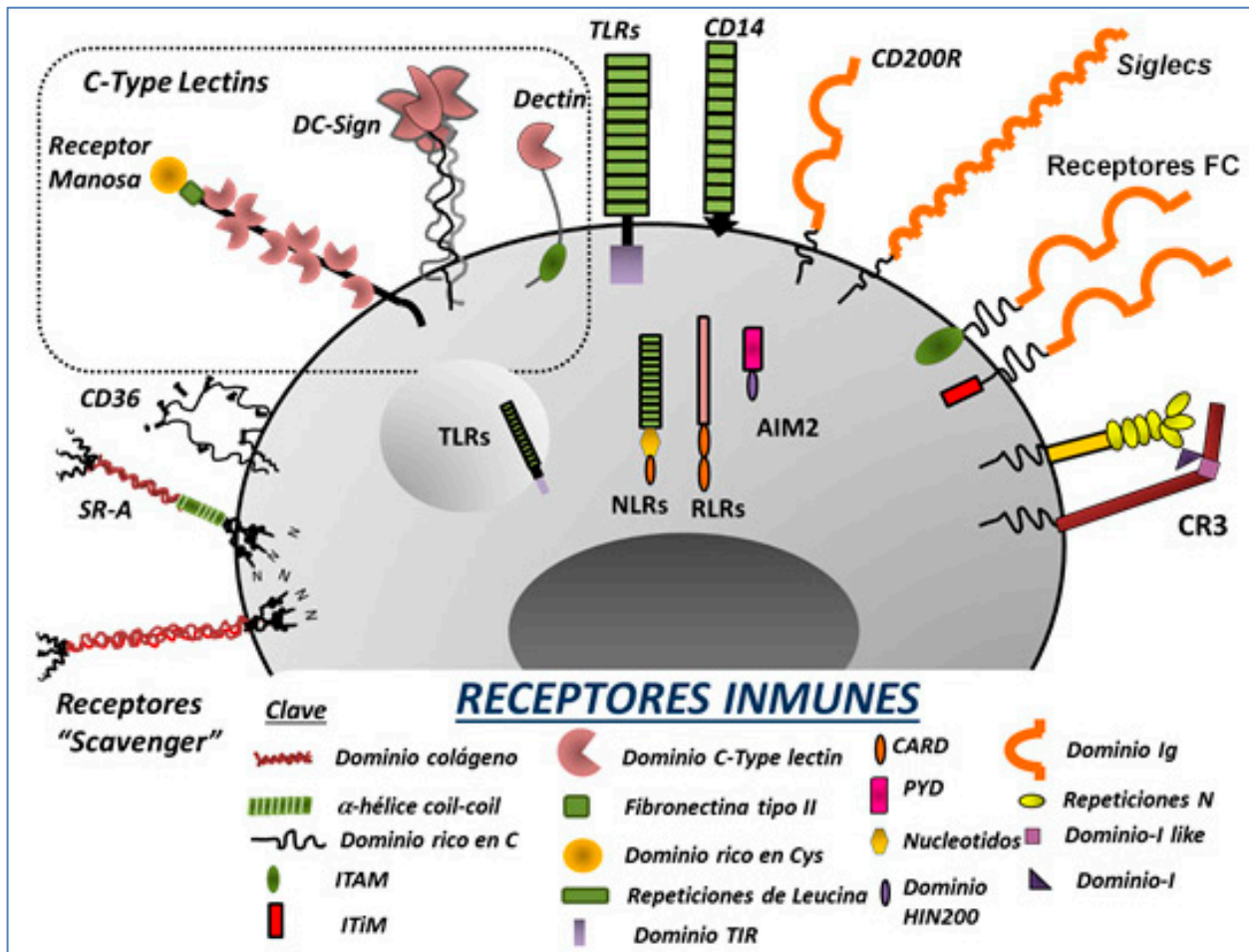


Figura 4. Introducción.- Estructura esquemática de los receptores de macrófagos. Los macrófagos expresan una amplia variedad de receptores, los cuales median el reconocimiento de moléculas propias y ajenas al organismo. Estos receptores fagocíticos de superficie incluyen receptores no opsónicos (como los receptores *C-type lectins* o receptores *scavenger*), así como receptores opsónicos (receptores de complemento y receptores Fc). Los receptores *Toll-like* o de tipo Toll (TLRs) son expresados en algunos casos en la superficie (como TLR4), mientras que otros son vacuolares (como TLR9). Los receptores también se encuentran en el citoplasma y estos incluyen los receptores *NOD-like* (NLRs), los receptores *RIG-like* (RLRs) y sensores de ADN (como AIM2). Los receptores no opsónicos tienen un rol potencial en enfermedades de tipo autoinmune; los receptores de Fc y del complemento son heterogéneos en estructura y expresión, y su función es desde activar a la de inhibir la respuesta de macrófagos, dependiendo del receptor o el ligando. Los macrófagos expresan además un grupo de receptores que reconocen fragmentos de moléculas del complemento como CR3, el cual tiene un papel en la eliminación de células apoptóticas. Los receptores Fc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tienen inmunoreceptores con activación basados en la tirosina o motivos inhibidores (ITAMs e ITIMs), el cual interactúa con otras moléculas de membrana y quinasas de citoplasma para regular las complejas vías de señalización. Abreviaturas: AIM2, ausente en melanoma 2; CARD, dominio de activación y reclutamiento de caspasa; CR3, receptor del complemento 3; FcγR, receptor Fc gamma; ITAM/ITIM; motivo de activación/inhibición de inmunoreceptores basados en la tirosina; MARCO, receptor de macrófagos con estructura de colágeno; PYD, dominio de pirina; SR-A, receptor *scavenger* A; Siglecs, lectinas similares a la inmunoglobulina de unión a ácido siálico.

En el cerebro dañado, se ha descrito la acumulación de DCs como parte de la respuesta inmune a lesiones neuroinflamatorias como son la isquemia cerebral y la neurodegeneración (Gelderblom *et al.*, 2009; Kostulas *et al.*, 2002). Muchas preguntas permanecen abiertas en el campo: ¿Cómo son activadas las células dendríticas y la microglía en una situación de inflamación estéril? ¿Cuáles son estos cambios y su implicación en el desarrollo de la neuroinflamación? ¿Hay cambios en el fenotipo de estas células con el propio proceso de envejecimiento?

En esta tesis nos hemos centrado en una familia de receptores como son los C-type Lectin receptor (CTLR). CTLR es una superfamilia de proteínas que contienen al menos un dominio lectina tipo C (CTLD) y que han sido a su vez clasificados en subgrupos dependiendo de la distribución de sus CTLDs, revisado en (Kerrigan y Brown, 2011). CLEC9A es un miembro de la familia V de CTLR, que está localizado dentro del clúster de Dectina: *Dectin cluster*. Este receptor también es conocido con el nombre de DNGR-1 (CLEC9A), es un receptor de lectina de tipo C que marca específicamente un subconjunto funcional de DC definido por la dependencia de BATF-3, IRF-8 e Id2. Los DCs diferenciadas que expresan DNGR-1 incluyen CD8 α + cDC (classical DC) en los tejidos inmunes y CD103⁺ DC en tejidos periféricos (Huysamen *et al.*, 2008; Iborra *et al.*, 2012; Poulin *et al.*, 2013; Sancho *et al.*, 2008; Schraml *et al.*, 2013). Ver Figura 2, Resultados. DNGR-1 participa en el reconocimiento de los antígenos de células muertas (Sancho, Joffre, *et al.*, 2009), y las DC DNGR-1⁺ podrían desempeñar un papel en la presentación de antígeno a las células T CD4⁺ y la presentación cruzada a las células T CD8⁺. Aunque la expresión de ARNm de Dngr-1/Clec9a en tejidos humanos y de ratón totales ha sido descrita, es muy notable la alta expresión de este ARNm en tejidos como cerebro, timo y bazo humano (Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). El análisis de la existencia de expresión de este marcador en cerebro de ratón, la localización y la identificación de las células que expresan este receptor ha sido uno de los objetivos de esta tesis (Quintana *et al.*, 2015).

Papel de las células mieloides cerebrales en el envejecimiento

1. Envejecimiento fisiológico

El envejecimiento es un proceso complejo de cambios acumulativos. Un punto clave es el progresivo declive en las funciones fisiológicas y capacidades conductuales, las cuales son observadas a varios niveles del organismo y en particular a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Glenn *et al.*, 2004; Lipsitz, 2002; Lipsitz y Goldberger, 1992; Smith *et al.*, 2005). Durante el envejecimiento, el SNC sufre numerosos cambios estructurales y funcionales de gran complejidad: la masa cerebral decrece del orden del 2 al 3% por década después de los 50 (Drachman, 2006). Las imágenes de resonancias magnéticas (MRI) y de morfometría basada en vóxel (Voxel-Based Morphometry o VBM) muestran que la edad especialmente afecta al volumen de materia blanca y gris en áreas prefrontales, parietales y temporales (Ge *et al.*, 2002; Salat *et al.*, 2004; Sowell *et al.*, 2003). A nivel celular, el acortamiento de telómeros y la inhibición de genes supresores de tumores, así como la acumulación de daño neuronal, estrés oxidativo e inflamación crónica leve son característicos de las células envejecidas. Varios tejidos, incluyendo al cerebro, muestran un desequilibrio entre los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias (Droge y Schipper, 2007; Vijg y Campisi, 2008).

2. Papel de la inflamación en el envejecimiento del cerebro

La asociación de inflamación y envejecimiento es un concepto ampliamente aceptado y los marcadores de inflamación se conocen como potenciales predictores del inicio de demencia asociados a edad (Ravaglia *et al.*, 2007). Es interesante señalar que muchos de los polimorfismos asociados a longevidad en humanos están relacionados con inflamación y la respuesta inmune como son interleuquina 6 (IL-6), TNF- α , IFN γ , IL-1 β , TGF β y proteína C reactiva (CRP). Así, individuos que presentan bajos niveles de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, o altos niveles de citoquinas antiinflamatorias, como interleuquina 10 (IL-10), han sido asociados con longevidad, de modo que una descompensación de los mismos es un factor de riesgo para enfermedad asociadas a la edad (Jylhava *et al.*, 2011).

Los cambios inducidos por un microambiente envejecido, como el aumento de la inflamación sistémica, el aumento de la permeabilidad de la BHE, y la degeneración neuronal y de otras células cerebrales, pueden contribuir a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha propuesto que la permeabilidad de la BHE aumenta en animales envejecidos (Blau *et al.*, 2012; Enciu *et al.*, 2013), facilitando quizás la infiltración por monocitos liberando

las ROS generadas en mitocondrias. Un aumento asociado a edad es el aumento del número de células CD11b⁺CD45^{high} (marcadores compatibles con infiltración de monocitos) y se ha descrito en el cerebro de animales envejecidos (Blau *et al.*, 2012). Del mismo modo, los niveles de expresión de moléculas quimiotácticas como IP10 (Interferon gamma-induced protein 10) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1/CCL2), están aumentadas en la región hipocámpal (Blau *et al.*, 2012).

La inflamación crónica también está asociada a un riesgo incrementado de declive cognitivo relacionado con la edad en varias especies, incluyendo roedores (Gemma *et al.*, 2005) y humanos (Dik *et al.*, 2005); en procesos de aprendizaje (Hein *et al.*, 2010) y formación de memoria y consolidación (Frank *et al.*, 2010). Se sabe que las citoquinas actúan directamente en las neuronas y afecta a sus funciones como excitabilidad y expresión génica (Lisak *et al.*, 2011). Particularmente, las citoquinas proinflamatorias disminuyen la expresión de genes de neuronas relacionados con aprendizaje y memoria (Godbout *et al.*, 2005). Sin embargo, la relación mejor documentada de citoquinas y deterioro cognitivo es con la IL-1 β . La expresión aumentada de IL-1 β en el hipocampo afecta a la memoria contextual y espacial en ratones (Hein *et al.*, 2010), así como la potenciación a largo plazo (Murray y Lynch, 1998). Además, se ha demostrado su papel mediador en la disfunción cognitiva inducida por lipopolisacárido (LPS) y estrés crónico en animales (Terrando *et al.*, 2010). Los ratones transgénicos a los que les falta la expresión de caspasa-1 (implicada en el pre-procesamiento de IL-1 β , una citoquina proinflamatoria) no sufren la pérdida de memoria contextual con el envejecimiento (Gemma *et al.*, 2005).

3. La microglía en el envejecimiento

Existen dos tipos principales de cambios asociados a envejecimiento de la microglía: cambios morfológicos y cambios funcionales en respuesta ante cualquier estímulo, ya sea endógeno o exógeno (Aguzzi *et al.*, 2013; Conde y Streit, 2006; Kettenmann *et al.*, 2013; Streit, 2006; von Bernhardi *et al.*, 2010).

3.1. Cambios morfológicos y en densidad de la microglía asociados a envejecimiento

Numerosos estudios registran cambios de la microglía con la edad. Muchos de esos cambios son también observados en condiciones de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Si hay una relación de causa-efecto entre el envejecimiento de las células de microglía y

la aparición de neurodegeneración está actualmente abierto a debate. Lo que sí se sabe es de la existencia de cambios a tres niveles: cambios morfológicos, en densidad celular y cambios funcionales.

En general, los **cambios morfológicos** observados en la microglía están caracterizados por una inicial retracción y reducción de procesos, muchas veces hipertróficos, y la presencia de áreas de arborización menores (Baron *et al.*, 2014). La microglía en el adulto sano joven, adopta una morfología característica en parénquima definido como *resting* (inactivada, quiescente o reposo) y desarrolla la típica morfología ramificada con muchos procesos finos. Está distribuida uniformemente a través del parénquima cerebral a modo de mosaico, sin solapar procesos entre ellas como se ha descrito anteriormente. Ante un daño o lesión (por ejemplo, lesión mecánica), la microglía cambia de morfología de forma dramática, engrosándose el citoplasma y acortándose los procesos. Sin embargo, este tipo de cambios tan claros en lesión aguda son mucho más sutiles en el envejecimiento. Con la edad, el orden y la regularidad de la distribución en mosaico de la microglía en el SNC también empiezan a deteriorarse. La microglía en la corteza de ratón envejecido está distribuida menos uniformemente que en la corteza de jóvenes; las células vecinas ocasionalmente tienen somas que están muy cercanos o incluso yuxtapuestas, en lugar de estar espaciados y claramente separados (Tremblay *et al.*, 2012). Los cambios asociados a la edad en la morfología de la microglía están poco caracterizados, a pesar de estudios en humanos ancianos en los que se ha caracterizado la existencia de una microglía “distrófica”, considerada así por algunos autores (Streit *et al.*, 2009; Streit *et al.*, 2004). Esta microglía de morfología irregular presenta anomalías citoplasmáticas tales como procesos desramificados, fragmentados o tortuosos, así como bultos esferoides protuberantes. Mientras estos cambios estructurales no han sido vistos en roedores de forma tan llamativa, si se ha descrito que la arborización de la microglía de ratón envejecido está significativamente reducida en tamaño y complejidad (Damani *et al.*, 2011; Streit *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2012).

En envejecimiento normal (Barreto *et al.*, 2014; von Bernhardi *et al.*, 2015) como en la EA (McGeer *et al.*, 1987; Streit *et al.*, 2009) la microglía adopta una forma típica, considerada como reactiva por la presencia de procesos cortos, gruesos y pobremente ramificados. Sin embargo, en un estudio en EA (Streit *et al.*, 2004; Streit *et al.* 2009), describen la existencia de estructuras neuronales positivas para tau que co-localizan invariablemente con microglía severamente distrófica (fragmentada); más que activada, la distrofia presente en la microglía precedía antes de la expansión de la tau. Los depósitos de proteína beta amiloide (A β) desprovisto de estructuras tau-positivas fueron encontradas que co-localizaban con microglía

no activada ramificada, sugiriendo que A β no disparó la activación microglial. En otros estudios posteriores (otros autores en envejecimiento normal (Rodríguez-Callejas *et al.*, 2016) o modelos *in vitro* (Luo y Chen, 2012) se llega a conclusiones similares.

Esto parece contradecir a las primeras observaciones registrando microglía activada o reactiva asociadas a las lesiones (McGeer *et al.*, 1987; Ohgami *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1997; Sheng *et al.*, 1997). Una de las posibilidades puede ser que, en los primeros estudios, la microglía distrófica no estaba reconocida como tal y se interpretaba como activada, probablemente añadido a que los primeros anticuerpos usados producían una incompleta visualización de las células microgliales. Otra posibilidad puede estar relacionada con la estructura dinámica de las placas de A β ; como estos depósitos evolucionan y experimentan cambios bioquímicos que podría ser un punto donde la microglía sí se vuelva activada y entonces progrese para volverse distrófica, concurrente con el inicio de la patología de tau. Incluso una tercera posibilidad plantea la presencia de infecciones sistémicas que puedan haber influenciado previo a la valoración de activación de microglía y neuroinflamación en el cerebro de los EA. Los ancianos y algunos pacientes con demencia tienen comorbilidad con infecciones sistémicas (como la neumonía) y ha sido demostrado que las enfermedades infecciosas fuera del SNC pueden profundamente influenciar la activación de la microglía (Figura 5). La progresiva degeneración de la microglía relacionado con la edad y la pérdida de neuroprotección de la microglía, más que la inducción de activación microglial, contribuye al inicio de los casos de EA esporádicos, ligados indiscutiblemente al envejecimiento según este modelo (Streit *et al.*, 2009).

Sólo un número muy limitado de estudios se han centrado en evaluar la **distribución y número de la microglía** en el cerebro usando técnicas estereológicas. Los resultados son controvertidos pero hay un consenso general de la existencia de una mayor densidad celular con la edad en varios compartimentos del SNC. Usando como marcador de microglía Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), se detecta un aumento en áreas como hipocampo (Adachi *et al.*, 2010; VanGuilder *et al.*, 2011) y corteza visual (Tremblay *et al.*, 2012). Usando Isolectina-B4 como marcador, se llega a las mismas conclusiones en hipocampo (Hayakawa *et al.*, 2007) pero, sin embargo con Mac-1 (CD11b), no se ven diferencias asociadas a edad en hipocampo (Long *et al.*, 1998) o sólo se vieron diferencias en hembras (Mouton *et al.*, 2002). El significado de este ligero aumento no parece del todo claro; una hipótesis aboga por un papel compensatorio, con el objetivo de mantener el nivel necesario de protección en conjunto, a medida que declina la capacidad funcional individual de la célula con la edad (Streit y Xue, 2010). Otros autores defienden que ese incremento es consecuencia

de una historia acumulativa de estímulos inflamatorios ambientales, como lesiones e infecciones, que habrían desencadenado episodios de proliferación microglial puntual que no fueron totalmente resueltos a nivel basal (Ajami *et al.*, 2007). El mecanismo subyacente de esta diferencia no ha sido examinado en profundidad pero, indirectamente, parece indicar una pérdida del control regulatorio de la microglía envejecida. Este incremento puede contribuir una baja tasa de proliferación basal (Ajami *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 1992) o de otro modo, un lento incremento en el reclutamiento de monocitos o macrófagos de la periferia.

Otra de las características morfológicas de la microglía en cerebro envejecido es la acumulación de grandes cantidades de gránulos autofluorescentes de lipofusina (Sierra *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2012), que aparecen en estudios de ultraestructura como inclusiones lisosomales (Peinado *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 2012).

3.2. Cambios funcionales de la microglía asociados a envejecimiento

Además de cambios en su anatomía, la microglía muestra cambios en su estado basal de activación. Si la microglía en los cerebros envejecidos es más o menos activa es un tema controvertido y depende de los marcadores de activación evaluados.

Tanto en humanos como en roedores adultos y sanos, la microglía expresa un fenotipo que se ha denominado de baja actividad o *down regulated* (Perry y Teeling, 2013). Se caracteriza por una baja expresión de marcadores relevantes en condiciones de activación como: CD68, implicado en procesos de fagocitosis; CD45, MHC II, FcγRs y DEC-205, importantes en la presentación de antígeno; CD11b y CD11c, moléculas de adhesión importantes en la migración celular y fagocitosis; F4/80, que contribuye a la inducción de la tolerancia periférica en células T reguladoras; Dectin-1, un receptor de patrones de reconocimiento no TLR expresado durante la activación no alternativa de macrófagos (Aloisi, 2001; Hart *et al.*, 2012; Norden y Godbout, 2013; Perry *et al.*, 2007; Puntener *et al.*, 2012). La expresión de muchos de estos marcadores, en general aumenta ante el daño o lesión cerebral (Conde y Streit, 2006; Perry *et al.*, 1993). En roedores, hay un aumento de células CD68⁺ tanto en la sustancia blanca como en la gris y se ha descrito la aparición de agregados MHC II positivos con la edad (Perry *et al.*, 1993; VanGuilder *et al.*, 2011).

Para describir el estado de activación de la microglía en los animales envejecidos, se ha utilizado el término de estado *primed* o de sensibilización aumentada. Este término indica el hecho de que la microglía en estos individuos presenta respuestas exageradas y más

prolongadas en el tiempo en respuesta a estímulos inflamatorios (Revisado en (Norden y Godbout, 2013)). Estudios basados en modelos animales de infección (Barrientos *et al.*, 2009; Norden y Godbout, 2013; Sierra *et al.*, 2007), derrame cerebral (Wasserman *et al.*, 2008; Wasserman y Schlichter, 2008), estresores fisiológicos y cognitivos (Buchanan *et al.*, 2008) y daño neurológico inducido por axotomía (Conde y Streit, 2006), las respuestas generadas en animales envejecidos tienden en general a ser mayores y más prolongadas que los animales adultos, culminando más en procesos de neurodegeneración y en muchos casos parecen causalmente relacionados con déficits neurológicos. En estudios relacionados con infección sistémica con *E. coli* y LPS, la inhibición de IL-1 β bloqueaba la repuesta inflamatoria y ésta se corresponde con menores déficits cognitivos (Barrientos *et al.*, 2012; Frank *et al.*, 2010). Consistente con estos marcadores de activación incrementada, la microglía envejecida expresa niveles incrementados de citoquinas inflamatorias (como IL-1 β , TNF- α , IL-6) *in situ* (Sheng *et al.*, 1998), en aislados *ex vivo* (Kohman *et al.*, 2013; Njie *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2007), o *in vitro* (Ye y Johnson, 1999). Estos cambios se han venido asociando con una susceptibilidad incrementada en modelos de infección sistémica con lipopolisacárido (LPS), con producción aumentada de citoquinas y respuestas a conductuales alteradas (Barrientos *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2009). La respuesta inflamatoria aumentada se piensa que podría suprimir la señalización de factores de crecimiento, particularmente BDNF o factor neurotrófico derivado del cerebro (Barrientos *et al.*, 2004) asociado con alteraciones cognitivas.

El consenso más general sobre la microglía en sujetos seniles es que existen cambios fenotípicos compatibles con el aumento de su estado de activación. La activación glial lleva a la neuroinflamación, la cual es cada vez más aceptada como parte de la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como la EA.

Sin embargo, otros autores han propuesto que la neurodegeneración puede ser causada por un mal funcionamiento de la principal célula implicada en la inmunidad innata del cerebro: la microglía (Figura 5). Esta teoría explica el envejecimiento basándose en la senescencia asociada a la microglía. La microglía experimenta bajos niveles de replicación bajo condiciones normales (Lawson *et al.*, 1992) y puede proliferar rápidamente ante perturbaciones (Ajami *et al.*, 2007). Sin embargo, varios estudios sugieren que el aumento de la capacidad proliferativa de la microglía no se pierde con la edad y de hecho, se puede ver aumentada bajo ciertas condiciones comparada con cerebros jóvenes (Huang *et al.*, 2009). En general, la cantidad de células senescentes aumentan con la edad y se asume que la senescencia contribuye al envejecimiento.

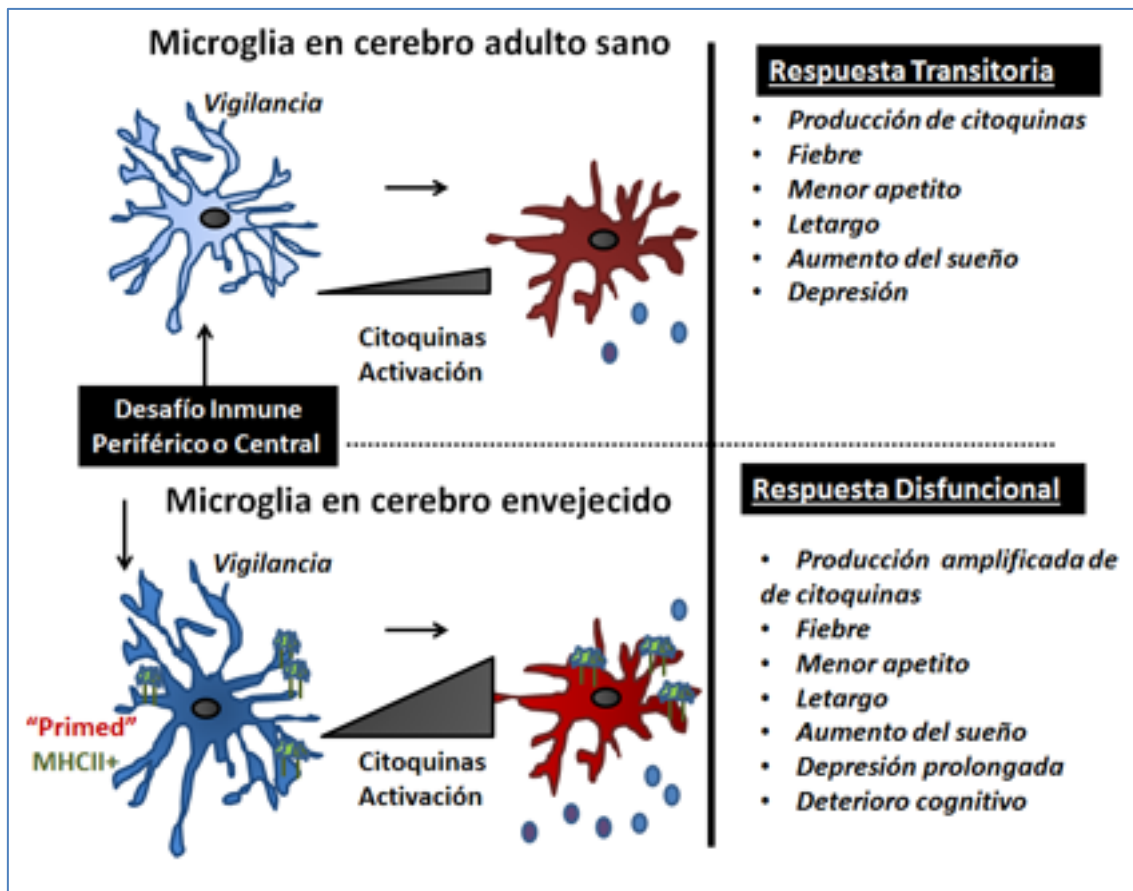


Figura 5. Introducción.- Cambios conductuales en el envejecimiento relacionados con el sistema inmune. Bajo condiciones normales, la microglía interpreta y propaga las señales inflamatorias que son iniciadas periféricamente o de forma central. La activación de la microglía incrementa la liberación de citoquinas y mensajeros secundarios, que dan lugar a repuestas fisiológicas pasajeras y conductuales beneficiosas para el hospedador (panel superior). Una consecuencia del aumento de microglía reactiva con la edad, es una repuesta hiperactiva a un estímulo inflamatorio con una producción amplificada y prolongada de citoquinas. En varios modelos de envejecimiento, una repuesta exagerada de citoquinas está asociada con el desarrollo de complicaciones cognitivas, de conducta y fisiológicas que se interpretan como maladaptativas para el organismo huésped (Norden y Godbout, 2013), como se muestra en el panel inferior. Se sabe que las citoquinas actúan directamente en las neuronas y afecta a las funciones de excitabilidad y expresión génica (Lisak et al., 2011). Particularmente, las citoquinas proinflamatorias disminuyen la expresión de genes de neuronas relacionados con aprendizaje y memoria (Godbout et al., 2005). Una vez en el cerebro, la respuesta inflamatoria puede afectar a las vías metabólicas y moleculares, influenciando los sistemas de neurotransmisores que en última instancia afecta a los circuitos neuronales que regulan la conducta, especialmente conductas relevantes a alteraciones de los ritmos circadianos del sueño, que disminuyen la motivación (anhedonia), conducta de evitación y de alarma (ansiedad), las cuales caracterizan varias afecciones neuropsiquiátricas incluyendo depresión; para más información: (Bryant et al., 2004; Dantzer et al., 2008).

El papel de la senescencia de las células microgliales propiamente dichas no está completamente dilucidado. Por tanto, es posible que la senescencia sea una respuesta compensatoria beneficiosa que contribuye a liberar los tejidos de células dañadas; este punto de control celular, sin embargo, requiere un eficiente sistema de eliminación celular que implica la retirada de las células senescentes y la movilización de progenitores para reestablecer el número de células. En organismos envejecidos, este sistema de recambio puede volverse ineficiente o agotarse la capacidad regenerativa de células progenitoras, ocasionando la

acumulación de células senescentes que pueden agravar el daño y contribuir al envejecimiento. Las células senescentes son típicamente objeto de una estricta vigilancia y control inmune y son eliminadas por fagocitosis. Siendo ellas mismas los fagocitos del cerebro, no está claro qué mecanismo hay subyacente, si es que lo hay en la limpieza de la propia microglía. El hecho de que estas células parecen acumularse a una tasa mayor de la que son retiradas, sugiere que una población heterogénea de microglía podría ocupar la población del cerebro envejecido (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

4. Células inmunes en el cerebro envejecido

Como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones de la integridad y permeabilidad de la BHE han sido descritas en el envejecimiento normal (Lee *et al.*, 2012). También, las proteínas de unión estrecha como ocludina y claudina-5 aumentan en el SNC envejecido (Lee *et al.*, 2012). De forma similar, alteraciones patológicas de la microvasculatura cerebral se ha observado en humanos envejecidos (Farrall y Wardlaw, 2009). Así mismo, se ha descrito una mayor entrada de leucocitos debido a la activación de la migración facilitada por el aumento de moléculas de adhesión (integrinas ICAM1) y receptores de quimioquinas atrayente de monocitos (MCP1/CCL2) o proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP1 α) (Aloisi *et al.*, 2000). Durante el envejecimiento, en el cerebro, la expresión de estas quimioquinas está aumentada. En paralelo, como hemos mencionado anteriormente, las células dendríticas tienen un papel principal como APCs y como coordinadoras de la respuesta inmune adaptativa. En el cerebro normal, se han encontrado en meninges y plexos coroideos pero no en parénquima en sujetos sanos (Bechmann *et al.*, 2007). Se ha observado una acumulación de células CD11c⁺ dependiente de la edad (Stichel y Luebbert, 2007). Además, estudios recientes también sugieren que la infiltración de monocitos puede originarse de una población de monocitos CD11c⁺ cuando la señalización de TGF β está comprometida. La mayoría de las células de la periferia que se infiltran en el BP lo hacen para los A β en un modelo animal de EA (Town *et al.*, 2008). Al teñir con el marcador de células T (CD3) se identificaron, de hecho, células T en el parénquima cerebral de ratones envejecidos (Stichel y Luebbert, 2007). Sin embargo, no hay estudios concluyentes de células CD11c positivas o células T en sujetos humanos envejecidos, salvo unos pocos estudios empleando muestras de controles envejecidos sin señales de alteración o enfermedad neurológica, donde se ha constatado la presencia de células T (Togo *et al.*, 2002).

5. Modelos animales de envejecimiento: SAM P8

En investigación básica, uno de los problemas básicos es la existencia de modelos animales *in vivo* que simule de la forma más fidedigna posible los signos y síntomas que ocurren en el ser humano.

Los ratones SAM P, ratones de senescencia acelerada (Senescence accelerated prone mouse), y su control SAM R, resistente a senescencia acelerada (Senescence accelerated resistant mouse), han sido durante mucho tiempo usados en la investigación sobre envejecimiento para estudiar fenotipos como la disfunción inmune, osteoporosis, y atrofia cerebral y el estrés oxidativo (Morley *et al.*, 2012; Pallàs, 2012). Tanto la cepa SAM R1 (R1) como la SAM P8 (P8) que se han utilizado en esta tesis fueron desarrolladas en la Universidad de Kyoto por el Dr. Toshio Takeda a partir de ratones AKR/J donados por el laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, USA) en 1968 y mantenidos mediante cruzamientos consanguíneos con otras cepas indeterminadas. Desde alrededor de 1972–1973 se registró, en ciertas camadas, una serie de características que variaban en severidad: caída de pelo, lesiones peri-oftálmicas, lordocifosis aumentada y muerte prematura; sin evidencia de retardo en el crecimiento, malformaciones, parálisis en miembros, u otros signos neurológicos (Takeda, 2009; Takeda *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 2005).

En el caso de la cepa SAM P8, se ha propuesto más recientemente como un modelo de neurodegeneración crónica similar a la que ocurre en la patología de enfermedad de Alzheimer asociada a envejecimiento de inicio tardío: Late onset-Alzheimer disease (LOAD). En el estudio de la Enfermedad de Alzheimer (EA), existen un gran número de modelos animales de ratón, donde han sido modificados por genes humanos que mimetizan distintos aspectos de EA, como los depósitos amiloideos y la acumulación de tau fosforilada. Sin embargo, modelos de LOAD, que son más del 90% de los casos diagnosticados de EA en humanos, han sido difíciles de desarrollar. Por lo tanto, modelos de envejecimiento que repliquen, al menos, algunas de las características celulares y moleculares de la LOAD son de gran interés. En el caso de la cepa P8, algunas características de la LOAD sí son reproducidas, como son: pérdida neuronal, distrofia de células cerebrales, acúmulos proteicos anómalos, etc. (Pallàs, 2012; Perry y Teeling, 2013).

5.1. Características generales de los SAM P8

Los ratones P8, además de las características comunes de las cepas SAMP (Takeda *et al.*, 1991), tiene un tiempo de supervivencia media de 12 meses (m) (Morley *et al.*, 2012). En el caso de la cepa resistente, R1 tiene un tiempo de supervivencia de 18,9 m. Este valor se corresponde con las cepas de ratones usadas más habitualmente, incluyendo C57BL/6, CBA y CD1-ICR.

A nivel del SNC, los P8 desarrollan de forma temprana déficits de memoria y aprendizaje (entre los 8 y los 10 m), junto a otras características similares a las vistas en la EA (Miyamoto *et al.*, 1986). Las hembras suelen desarrollar cambios en la memoria con la edad mucho menos robustos que los machos y por esta razón la mayoría de los estudios han sido llevados en machos P8 (Morley *et al.*, 2012). A nivel conductual, los ratones P8 mostraron desórdenes emocionales asociados a la edad, caracterizado por conducta ansiosa reducida y comportamiento depresivo (Miyamoto, 1997; Miyamoto *et al.*, 1992). Además, presentan alteraciones en los ritmos circadianos de actividad motora espontánea y de conducta de bebida (Miyamoto, 1997). Otros de los cambios observados es la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* y neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* (Karasawa *et al.*, 1997).

En ratones SAM, algunos autores describen proliferación de microglía hipertrófica reconocible usando F480 en SAMP 10, P8 y R1 con la edad, sin diferencias significativas entre cepas (Amano *et al.*, 1995). Otros autores describen también un aumento en inmunoreactividad de CD45 con la edad en hipocampo (Kawamata *et al.*, 1998).

Se han observado estructuras proteicas granulares inmunoreactivas para Beta/A4 (A β) en varias regiones cerebrales como hipocampo, corteza cerebral, cerebelos, algunos núcleos de nervios craneales, área septal o medial, (Takemura *et al.*, 1993). Las formas A β asociadas a edad incrementan en hipocampo de 4 a los 12 m; sin embargo no se han identificado estructuras parecidas a placas, ni por Congo red ni por tioflavina S. Sin embargo, sí se ha detectado un aumento de hiperfosforilación de Tau (Canudas *et al.*, 2005). A nivel de hipocampo, aparecen formaciones granulares monoamino-oxidasa-B-positivas (MAOB) en ratones envejecidos (Nakamura *et al.*, 1995).

Los P8 mostraron procesos de degeneración esponjiforme en células madre del cerebro, junto a procesos de astrogliosis (Diaz-Moreno *et al.*, 2013; Yagi *et al.*, 1989) y

estructuras granulares PAS-positivas en la formación hipocampo (Akiyama *et al.*, 1986).

A nivel inmunológico, en los P8 se observa astrogliosis en hipocampo, corteza piriforme, núcleos de células madre y sustancia blanca (Kawamata *et al.*, 1998), así como agrupaciones en forma de clústeres o microglía hipertrófica y activada alrededor de las vacuolas en regiones de células madre (Amano *et al.*, 1995). Junto a este posible proceso de exacerbación de la repuesta inmune, converge con un deterioro generalizado en la inmunidad periférica, como involución del timo, pérdida de células T CD4⁺ (Th), capacidad de producción de anticuerpos disminuida y disfunción en las APCs (Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011). Asimismo, la actividad de las células natural killer también estaba reducida con la edad tanto en R1 y P8 pero sin diferencias entre cepas (Powers *et al.*, 1992). Por otro lado, otros estudios constatan alteraciones en la BHE asociado a edad (Vorbodt *et al.*, 1995), resultando en una eliminación disminuida de la proteína β -amiloide del cerebro (Morley *et al.*, 2012).

A nivel genético, en un estudio reciente se identificaron 51 SNVs (variantes de un solo nucleótido) en los animales P8 que difieren de ratones R1. Sobre el 50% de los genes identificados tenían un papel en cerebro. Los genes afectados principales expresados en cerebro fueron APBA3, implicado en el procesamiento de la APP, TMEM55B, una fosfatasa implicado en el sistema inmune, TESK1, una quinasa implicada en la espermatogénesis e ISFR2 (Delerue *et al.*, 2013), un regulador negativo de la memoria así como un inhibidor de la potenciación a largo plazo inducida a través del receptor NMDA (Irvine *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2012).

Por último, a nivel de enzimas, presenta disminución en la actividad de enzimas que detoxifican las especies de oxígeno como MnSOD, catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPX) (Kurokawa *et al.*, 2001).

5.2 SAM P8 como modelo de Enfermedad de Alzheimer asociada a envejecimiento

Como se indica en la descripción general de la cepa SAM P8, esta cepa no sólo se ha considerado un modelo de envejecimiento prematuro, si no que algunos autores lo proponen como modelo de la EA esporádica o asociada a envejecimiento (LOAD), que constituye la gran parte de los casos de EA en humanos, para más información (Morley *et al.*, 2012). Los hallazgos que se han encontrado son un aumento del estrés oxidativo (Yasui *et al.*, 2003) acúmulos del péptido A, gliosis e hiperfosforilación de la proteína Tau (Canudas *et al.*, 2005).

Además se ha observado un aumento de la proteína precursora de beta amiloide (APP) con la edad (Kumar *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2012). Estos hallazgos junto al hecho de que los déficit cognitivos que se observan en estos animales puedan revertirse con el uso de oligonucleótidos inhibidores del ARNm de APP, o con el uso de anticuerpos anti- A β (Kumar *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2000): Revisado por (Morley *et al.*, 2012; Poon *et al.*, 2004) sugiere que la cepa P8 puede ser un modelo complementario de EA asociada al envejecimiento.

El segundo objetivo principal de esta tesis ha sido precisamente, analizar los cambios morfológicos de la microglía en este modelo de envejecimiento.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación:

Existen evidencias que indican un papel de la neuroinflamación en el envejecimiento y en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el papel de las células mieloides del cerebro y la microglía en particular en estos procesos no está completamente dilucidado.

Esta Tesis Doctoral se centra en el aislamiento y caracterización de las células mieloides cerebrales, y los cambios existentes en microglía en procesos de envejecimiento patológico en el modelo de ratón de senescencia acelerada SAM P8.

Los objetivos específicos son los siguientes:

El objetivo 1: aislamiento y caracterización de las diferentes subpoblaciones de células mieloides en parénquima cerebral, meninges y plexos coroideos en el cerebro de ratones adultos sanos.

- 1.1. Caracterización morfológica de células mieloides en el cerebro de ratón adulto.
- 1.2. Aislamiento de las células mieloides en el ratón adulto sano.
- 1.3. Caracterización de células DNCR-1/CLEC9A positivas en cerebro de ratón adulto en homeostasis.

El objetivo 2: caracterización de las alteraciones de las células de microglía en hipocampo del ratón SAM P8, como modelo de envejecimiento acelerado.

- 2.1. Evaluación de las alteraciones asociadas a envejecimiento en el cerebro de SAM P8.
- 2.2. Cuantificación y caracterización de cambios morfológicos de microglía en SAM P8 con la edad.
- 2.3. Caracterización del fenotipo de la microglía en el modelo SAM P8 con la edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

1. Líneas transgénicas

1.1. Ratones c-fms-EGFP (Csf1r-EGFP): B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP) 1Hume/J

Los ratones c-fms-EGFP/Csf1r-EGFP han sido descritos en (Sasmono *et al.*, 2003). En el campo también se les conoce con el nombre de MacGreen. Estos ratones expresan la proteína EGFP dirigida por el promotor de c-fms (Csf1r). El gen c-fms se expresa en macrófagos, linajes de células de trofoblasto, y hasta cierto punto en granulocitos. Estos ratones han sido muy utilizados para la visualización de células de origen mieloides en muchos tejidos (Elmore *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2010; MacDonald *et al.*, 2005; Mooney *et al.*, 2010; Sierra *et al.*, 2007; Verdonk *et al.*, 2016).

1.2. Ratones CX3CR1-GFP: B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J

Los ratones CX3CR1-GFP expresan la proteína EGFP en monocitos, células dendríticas, células NK (natural killer) y la célula de microglía en el cerebro (Jung *et al.*, 2000). Los ratones CX3CR1-GFP son un *Knock in* y por ello en todos los experimentos se usaron animales heterocigotos Cx3cr1^{gfp/+}. Animales Cx3cr1^{gfp/+} son haploinsuficientes, pero el fenotipo de la microglía, a pesar de la menor expresión del receptor, es semejante a la de los animales que llevaban el transgen GFP bajo el promotor de Iba-1 (Hirasawa *et al.*, 2005). No se observan cambios morfológicos y conductuales en estos animales. Se emplearon animales machos con edades comprendidas entre 1 y 2 meses (m) (clasificados como jóvenes), los 10 m (para los adultos) y 14 m (seniles).

1.3. Ratones Clec9a^{egfp/egfp} (deficientes en DNGR-1)

Los Ratones Clec9a^{egfp/egfp} han sido descritos anteriormente y fueron donados por el Dr D Sancho del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, ISCiii) (Sancho *et al.*, 2009). Estos ratones son deficientes para el gen Dngr-1/cle9a y tienen un fondo genético C57BL/6. Fueron retrocruzados más de 10 veces a C57BL/6J-Cr.

2. Líneas no transgénicas

2.1. Ratones SAM P8 y R1

Para este estudio se ha utilizado un modelo animal de envejecimiento acelerado: los ratones SAM P8 (P8) (Senescence Accelerated Mouse Prone 8) y la cepa control y resistente a envejecimiento SAMR1 (R1) (Senescence Accelerated Mouse Resistant 1). Ambas cepas fueron desarrolladas en la Universidad de Kyoto a partir de ratones AKR/J (Takeda, 2009; Takeda *et al.*, 1981). La cepa SAMP8 es susceptible de sufrir envejecimiento prematuro y por ello se ha propuesto como posible modelo de enfermedad de Alzheimer asociada a envejecimiento. Las cepas para este estudio fueron cedidas por la Dra. Helena Mira del Instituto de Salud Carlos III (ISC III). Los ratones R1 y P8 fueron estabulados en condiciones libres de patógenos específicos (SPF) y cruzados siguiendo las directrices indicadas (Tanaka *et al.*, 2005). Las hembras de SAMP8 parecen tener cambios menos robustos de memoria que los machos y por esa razón la mayoría de los estudios han sido llevados en machos (Flood *et al.*, 1995).

2.2. Ratones CD1-ICR y C57/BL6

Como control de posibles características propias de la cepa SAM, se emplearon ratones control: CD1-ICR y los C57/BL6 jóvenes y envejecidos. Estas cepas proceden del animalario del CNM del Instituto de Salud Carlos III. Dada la mayor capacidad de supervivencia en condiciones de estabulación de los ratones C57BL/6, se usaron hasta edades de 23 m.

Todos los ratones que forma parte de este estudio fueron estabulados y manipulados en las condiciones establecidas por el Comité Ético de la Investigación y del Bienestar Animal (CElyBA) del Instituto de Salud Carlos III. Todos los procedimientos con animales fueron realizados para minimizar el sufrimiento animal y reducir el número de animales usados de acuerdo a la normativa de la directiva EU 2010/63EU y de la recomendación 2007/526/EC referida a la protección de animales usados en investigación y para otros propósitos científicos, recogida por la ley española bajo el Real Decreto 1201/2005.

3. Tratamientos de los animales

3.1. Tratamiento con Flt3L

Para la amplificación selectiva de células dendríticas, se usaron células de melanoma de ratón B16 que secretan Flt3 (FMS-like receptor tyrosine kinase 3). Las células B16-Flt3L fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS (Iborra *et al.*, 2012) y se inyectaron a una concentración de $\sim 5 \times 10^6$ B16 células tumorales secretoras de Flt3L en uno de los flancos.

Para el experimento, se usaron ratones macho de fondo genético C57BL/6, con edades comprendidas entre las 6 y 12 semanas, a los que se les inyectó de forma subcutánea (s.c.) tratamiento (+Flt3L) o vehículo (sin inyectar). Entre los 12 y 16 días después de la inyección, con tumores de un diámetro alrededor de 1cm, los ratones fueron sacrificados y perfundidos con PBS.

Aislamiento de células mieloides de cerebro adulto

Los ratones fueron sacrificados y perfundidos vía intracardiaca con PBS (tampón fosfato salino) 0,1M a pH 7,5 hasta observar que los bazo se blanquean durante 5 minutos a una velocidad de 5 ml/min. A continuación, se retira el encéfalo y se disecciona, separando membranas meníngeas (piamadre) y plexos coroideos (m/Ch) del parénquima cerebral con unas pinzas de disección finas, empleando una lupa de disección (Leica S6E). Para extraer los plexos coroideos, se realizó un corte coronal a la altura aproximada de -5,2 mm de Bregma (pasando el colículo inferior, al comienzo del cerebelo). A continuación, se retiran los plexos coroideos situados en los ventrículos de la parte basal del cerebro (4V, indicado con el número 1 en la Figura 1, panel A). Se diseccionan las meninges en contacto con el encéfalo, y se descarta cerebelo, mesencéfalo, rombencéfalo y bulbos olfatorios (Figura 1, panel A con los números 1 y 3). Posteriormente, se realizó otro corte a la altura aproximada de 1,5 mm de Bregma para acceder a los plexos coroideos de los ventrículos laterales y tercero (VL y 3V) (Figura 1, número 2 del panel A).

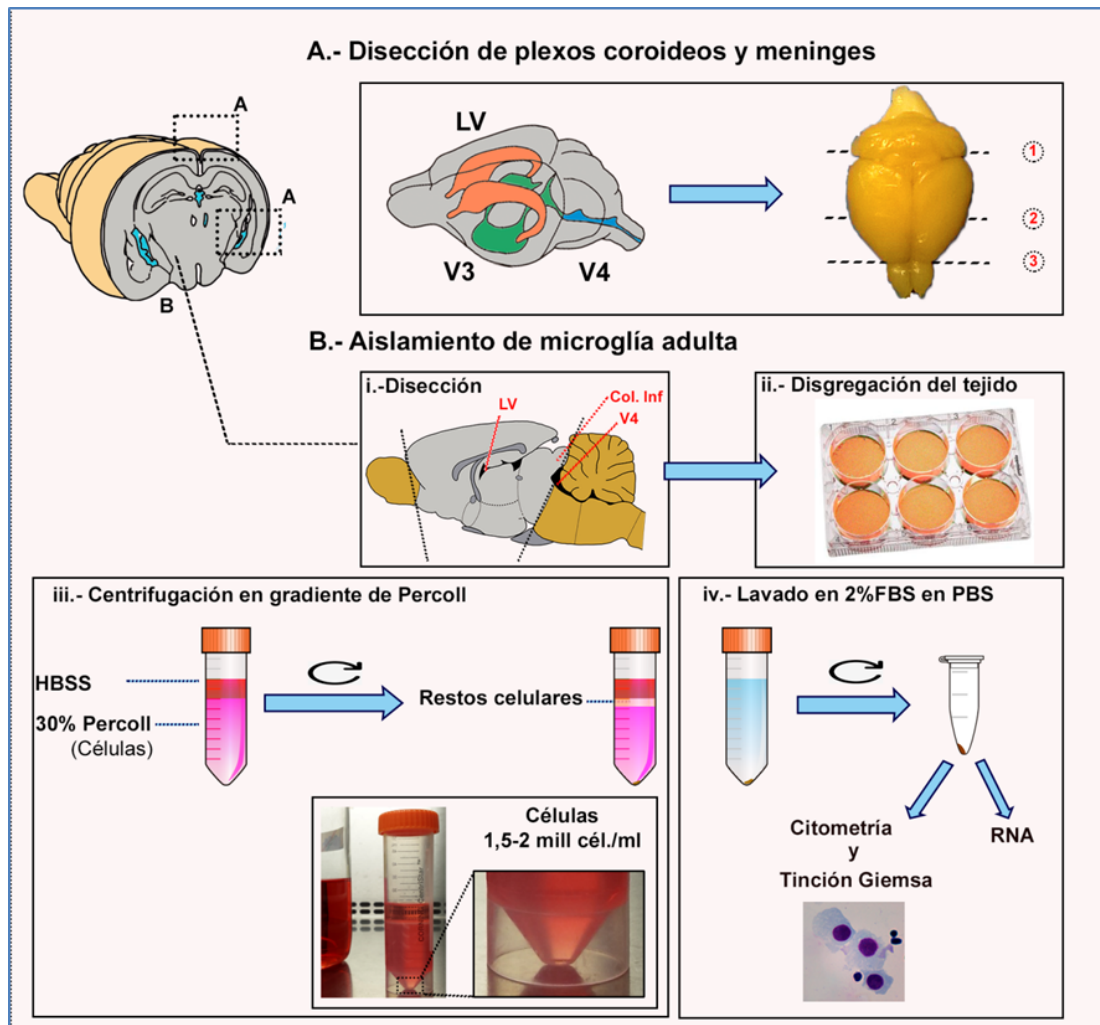


Figura 1. Materiales y Métodos.- Procedimiento para la extracción de células mieloides en el encéfalo. A. Disección de plexos coroideos y meninges. Se indican las zonas donde aproximadamente se realizaron los cortes coronales para acceder a las cavidades ventriculares y extraer los plexos coroideos (1, 2), así como las zonas de corte (1 y 3). B. Aislamiento de microglía adulta. Las células del encéfalo (panel i, descartándose las áreas marcadas en amarillo) se disgregaron con ayuda de papaína (panel ii) y se aisló microglía adulta mediante un gradiente de Percoll (panel iii). El precipitado obtenido de células se lava en PBS con un 2% en FBS y, según necesidad, parte se destina para RNA y otra parte para citometría y tinción de Giemsa para corroborar el perfecto aislamiento (iv). Abreviaturas: VL, ventrículos laterales; V3, tercer ventrículo; V4, cuarto ventrículo; col. Inf., colículo inferior.

Una vez obtenido el cerebro sin m/Ch, las células fueron preparadas como indican en un estudio previo (Sierra *et al.*, 2007) con modificaciones. Cada cerebro, separado de m/Ch y descartado cerebelo, fue digerido en 5 ml de solución enzimática (20 unidades/ml papaína (Worthington) y 0,025 unidades/ml DNasa (Sigma-Aldrich) en un tampón conteniendo: 116 mM de NaCl (Sigma-Aldrich), 5,4 mM KCl (Sigma-Aldrich), 26 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich), 1 mM NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich), 1,5 mM CaCl₂ (Merck), 1 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich), 0,5 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 25 mM glucosa (Sigma-Aldrich) y 1 mM L-cisteína, pH 7,5 (Sigma-Aldrich). La mezcla con proteasa se deja durante 30 min a temperatura ambiente (RT) en agitación. Pasado el tiempo de incubación, se homogeniza con pipetas Pasteur de puntas romas y se pasó el

homogenado a través de un filtro de 70 μm con el fin de descartar los fragmentos no digeridos. Inmediatamente, se paró la reacción lavando con HBS y 5% FBS y se centrifugó a 300g durante 7 minutos, descartando sobrenadante. Por último, las células se resuspendieron en 30% de Percoll (GE Life sciences) y se montó un gradiente (Figura 1 B, panel iii), añadiendo en la superficie 5ml de HBSS y centrifugando a 300g durante 20min a RT con aceleración lenta y sin freno.

Seguidamente, se recogió el pellet y se lavó con HBSS centrifugando durante 7 minutos a 300g. Todos los lavados subsecuentes fueron realizados con PBS frío, conteniendo 2% de FBS (vol/vol). Como resultado, esta muestra contiene microglía/macrófagos del cerebro como fue descrito en (Carson *et al.*, 1998), con la salvedad de que no incluye membranas de meninges y plexos coroideos; vamos a referirnos a esta preparación celular como células mieloides del cerebro sin m/Ch, o células del parénquima cerebral (BP).

Para aislar células de las membranas m/Ch, se juntaron en un pool las membranas de al menos 3 animales por ensayo y se incluyeron en un 1 ml de PBS en tubo *Eppendorf* (Figura 1 B, panel i). Los tejidos fueron tratados con 2,5 mg/ml de pronasa (Roche) con 0,025 unidades/ml DNasa (Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 min a 37°C en un baño en agitación, intentando homogenizar y bajando las células en ciclos de 10 minutos. A continuación, se homogenizó con ayuda de una pipeta de puntas romas y se pasó por un filtro de 70 μm .

Las muestras destinadas a RNA se centrifugan por última vez y se congela el *pellet* a -20°C hasta su procesado; las suspensiones celulares destinadas a tinciones Giemsa se lavaron una vez más en PB sin FBS, para corroborar que el aislamiento fue correcto, y las destinadas a citometría se dejan en PB con 2% FBS en hielo hasta su uso (Figura 1 B, panel iv).

Citometría de flujo

La células se resuspenden en un volumen fijo para todas la muestras de tampón de tinción o *staining buffer* (que contiene 2,5% FBS en PBS; Biowhittaker, Lonza Group) a las que se les añade 10 $\mu\text{g/ml}$ de 2.4G2 mAb (Fc block, CD16/ CD32) (BD Biosciences), para el bloqueo de las uniones inespecíficas a los receptores Fc γ . La tinción de células sigue las directrices de protocolos estándar para citometría: 30 minutos en incubación con primarios en hielo con 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 2% FBS y 0,02% de azida sódica (Riedl-de Haën), seguido de 2 lavados en PBS con 2,5% FBS. Los anticuerpos y reactivos usados están

indicados en las Tablas 1 y 2. Los anticuerpos acoplados a fluoróforos específicos para ratón CD45, CD11b y MHC II fueron de la casa comercial de BD Biosciences o Biolegend. Una vez teñidas, las células fueron analizadas en un citómetro FACSCanto usando de software para su análisis el FlowJo versión 6.3.4 (Tree Star, Ashland, OR).

Técnicas histológicas

1. Fijación

Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla diluida en suero salino de 80-120mg/kg de ketamina (Imalgene 1000, Merial) y 5-16mg/kg de xilazina (Xilagesic 20%, Calier). Para los estudios de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, los tejidos se fijaron mediante perfusión intracardiaca con 4 % paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en 0.1M, pH 7,4 de tampón fosfato (PB, Sigma-Aldrich). Para la perfusión transcardiaca, se les practica una toracotomía para acceder al corazón; a continuación se coloca un catéter en el ventrículo izquierdo con ayuda de una palometa conectada a una sonda por donde circularán los fluidos. Una vez que se comienza a lavar, se realiza un corte en la aurícula derecha para eliminar los fluidos del circuito sanguíneo. Los animales se perfundieron con ayuda de una bomba peristáltica (Thermo Fisher) a un flujo constante de 6 ml/min con 25-30 ml de solución salina (0.9% NaCl; Sigma-Aldrich) con el objetivo de eliminar todas las células circulantes de la sangre. En ratones jóvenes, el flujo se bajó a 5 ml/min.

2. Post-fijación

Una vez fijados los cerebros, se abrió el cráneo con unas tijeras finas, se extrajo el cerebro y se sometió a un proceso de post-fijación por inmersión en 15-20ml de 4% PFA en PB 0,1M durante 18-20 horas a 4°C en agitación. Pasado este tiempo, se lavó en PB 0,1M unas 5-6 veces a RT y se dejaron almacenados en PB 0,1M, pH 7,5 con 0,06 % azida sódica (Riedel-de Haën) hasta el momento de su uso.

3. Procesamiento del tejido

3.1 Material procesado para criostato

Mediante esta técnica se procesaron los tejidos empleados en inmunohistoquímica y la

mayor parte de tejidos de inmunofluorescencia. Para evitar la formación de cristales debido a la congelación del agua presente en el tejido, los cerebros se sumergieron en concentraciones crecientes de sacarosa; primero sumergido al 15% de sacarosa (p/v) en PB 0,1 M, pH 7,4 a 4°C y en agitación hasta hundirse los cerebros (lo que indica que la sacarosa ha penetrado en el tejido); por último, al 30% de sacarosa (p/v) en PB 0,1 M, pH 7,4 durante 72 horas a 4°C. Finalmente, se incluyeron los cerebros en moldes con medio de congelación de tejidos (Tissue-Tek O.C.T.TM, Sakura) y se congelaron de forma rápida sumergiéndolos en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich) enfriado en hielo seco. Los cerebros así procesados se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Una vez embebido el cerebro, se realizaron cortes coronales usando un criostato CM1950 (Leica Microsystems) siguiendo el mismo procedimiento al descrito por Díaz-Moreno (2013) para reconstrucciones tridimensionales de regiones del cerebro (Figura 3B, panel i), generando secciones de 30 µm que se recogieron en series de 10 portaobjetos, de forma que cada portaobjetos contenía una reconstrucción anteroposterior del cerebro. Cada una de las 6 secciones del cerebro de cada porta quedaron separadas 300 µm entre ellas.

Los portas se almacenaron a -20°C hasta su uso. Los portaobjetos usados se trataron con el preparado comercial *Histogrip* (Thermo Fisher) o se usaron portaobjetos ya tratados de polilisina y superfrost ultra plus (Termo Fisher).

3.2. Material procesado para vibratomo

En reconstrucciones 3D de membranas, los cerebros se procesaron en el vibratomo. Los cerebros para tal fin se cortaron generando secciones horizontales de un grosor de 80 µm (Leica Microsystems VT1200s). De esta forma, los primeros cortes que recogen pertenecen a la membrana meníngea. Los cortes se almacenaron en flotación con PB 0,1 M y azida sódica al 0,05 % (p/v) (Riedl-de Haën) a 4°C hasta su uso.

4. Tinciones generales

4.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)

El protocolo usado deriva de los descritos en Bancroft (Suvana *et al.*, 2013). Los cortes de criostato que han sido secados mínimo 24 horas a RT para permitir la mayor adherencia del corte a la sección, se rehidratan manteniéndolos 5 minutos en concentraciones decrecientes de

alcohol: 100%, 96% y 70% (Panreac) hasta que finalmente se dejaron en agua 5 minutos. A continuación, se sumergen los tejidos en Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos y se lavan en agua 5 minutos. Para rebajar la tinción en algunos casos, se dejaron 3 minutos en alcohol ácido (HCl al 0,5%) y rápidamente se volvieron a lavar en agua. Tras este paso, se dejó en *Bluing* (Thermo Fisher) durante 1 minuto y se lavaron otros 5 minutos en agua. Para aumentar el contraste, se sumergió en alcohol 70% y se procedió a continuación a meterlo en eosina (Thermo Fisher) 1 minuto para lavar posteriormente en agua 5 minutos más. Por último se realiza la cadena de deshidratación del tejido sumergiéndolo consecutivamente en concentraciones crecientes de alcohol (96% y 100% porque se parte del 70%) durante 5 minutos y se deja en xilol (2 lavados de 10 minutos) para montar con DPX (Sigma-Aldrich).

5. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó principalmente sobre secciones de criostato. Los portaobjetos se secan durante un mínimo de 2 horas para evitar que se desprendan. En la mayoría de los experimentos, se recurrió al método de tinción indirecta estándar: Una primera incubación con un anticuerpo primario, seguido de una incubación con anticuerpo secundario unido a fluoróforo o biotina, como se especifica en las Tablas 1 y 2.

Las muestras se incuban previamente en un tampón de bloqueo (0,1M de PB conteniendo 10% FBS (Hyclone), 0,25% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) y 150 mM de glicina (Merck) durante 1 hora. A continuación, se incubaba con la dilución adecuada de cada anticuerpo (Tabla 1) y rebajando las condiciones de bloqueo (1% de FBS y 0,6Tx100) toda la noche (2 horas para GFAP) en cámara húmeda y oscuridad a 4°C. Al día siguiente, tras lavar las células (los lavados siempre son realizados con PB 0,1M), se incubaron con los anticuerpos fluorescentes o biotinilados (Tabla 2) en tampón bloqueo durante 1 hora en cámara húmeda, a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se empleó el 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (5µg/mL, Life technologies) para marcar por fluorescencia núcleos y se montaron los portas con un medio de montaje Mowiol con Dabco 2,5% (v/v). Para tinción de secciones de vibratomo (cortes horizontales que contienen las membranas meníngeas y el comienzo del parénquima cerebral), el procedimiento ha sido el mismo pero realizando las incubaciones y lavados en agitación. Para detectar la expresión de microglía, se usó de anticuerpo rabbit anti-Iba-1 (1:100, Wako); para la visualización de células presentadoras de antígenos, se usó el rat anti-mouse I-A/I-E (1:100, clone 2G9, B.D. Pharmingen); para detectar la expresión de la membrana basal, se usó Rabbit anti-panlaminina (L9393 Sigma-Aldrich); y para detectar la expresión de células endoteliales, se usó Rat anti-mouse CD31 (clone

MATERIALES Y MÉTODOS

MEC13.3 BD Pharmigen). Los detalles de los anticuerpos utilizados se especifican en la Tabla 1. Los anticuerpos secundarios usados se marcaron en fluorocromos Cy3, 488 y 647 (Jackson Immunoresearch). Los Controles se usaron omitiendo el anticuerpo primario; los controles MHC II se procedió de idéntica forma, pero se incorporó el isotipo Rat IgG2ak acoplado a fluoróforo. Las secciones fueron finalmente contrateñidas y montadas en una mezcla de Mowiol/50% DABCO (Sigma-Aldrich). Las características de todos los anticuerpos vienen descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales y Métodos.- Anticuerpos usados en citometría de flujo/inmunofluorescencia

| Anticuerpo | Clon | Proveedor | Isotipo | Cat. | Uso* |
|--|-------------|---------------|---------------------------|-----------|--------|
| Rabbit anti-Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) | Polyclonal | Wako | n/a | 019-19741 | IF, FC |
| PE-Cy7 Hamster anti-mouse CD11c | HL3 | BD Pharmigen | Hamster IgG1, λ 2 | 558079 | FC |
| Biotin anti-mouse CD11c | N418 | BioLegend | Armenian Hamster IgG | 117303 | IF |
| Rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc block) | 2.4G2 | BD Pharmigen | Rat IgG2b, k | 553141 | FC |
| FITC Rat anti mouse I-A/I-E | 2G9 | BD Pharmigen | Rat IgG2a, k | 553623 | IF, FC |
| APC Rat anti mouse IA/IE | M5/114.15.2 | BioLegend | Rat IgG2b, k | 107613 | FC |
| PE Cy7 Rat anti mouse CD45 | 30-F11 | BD Pharmigen | Rat IgG2b, k | 552848 | FC |
| APC/Cy7 anti-mouse/human CD11b | M1/70 | BioLegend | Rat IgG2b, k | 101226 | FC |
| Biotin anti-mouse CD11c | N418 | BioLegend | Armenian Hamster IgG | 117303 | IF |
| Rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) | MEC 13.3 | BD Pharmigen | n/a | 553369 | IF |
| Rabbit anti-PAN LAMININ | Polyclonal | Sigma-Aldrich | n/a | L9393 | IF |
| Rabbit anti-GFAP | Polyclonal | Dako | n/a | Z033429 | IF |
| Mouse Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) | JBW301 | Millipore | n/a | 05-636 | IF |

* FC, citometría de flujo; IF, tinción de inmunofluorescencia.

Tabla 2. Materiales y Métodos.- Listado de anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencia.

| Nombre | Abs. | Especie | Tipo | Dilución |
|--------------|------|---------|-------------|----------|
| Alexa Fluor | 488 | Donkey | Anti-goat | 1/500 |
| Alexa Fluor | HRP | Donkey | Anti-mouse | 1/200 |
| Alexa Fluor | 488 | Donkey | Anti-mouse | 1/500 |
| Alexa Fluor | HRP | Donkey | Anti-rabbit | 1/200 |
| Alexa Fluor | 647 | Donkey | Anti-rabbit | 1/250 |
| Cy3 | 594 | Goat | Anti-rabbit | 1/500 |
| Alexa fFluor | 488 | Donkey | Anti-rat | 1/200 |
| Cy3 | 594 | Goat | Anti-rat | 1/500 |
| Alexa Fluor | 647 | Donkey | Anti-rat | 1/250 |
| DAPI | UV | | DAPI | 1/1000 |

Para anticuerpos de antígenos intracelulares y nucleares como el caso de anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) se realizó un paso previo de desenmascarar antígenos (*antigen retrieval*), hirviendo en tampón Citrato pH 6,0.

Para anticuerpos como CD11c, se tuvo que recurrir a un sistema para amplificar la señal con tiramida. La autofluorescencia se corrigió con un paso previo de 10 minutos en NH_4Cl a 50mM. A continuación, se usó un kit comercial ya preparado para bloquear la biotina endógena y se dejaron las secciones 15 minutos lavadas en solución de avidina, seguidos de 15 minutos lavadas en solución de biotina (Vector), dejando escurrir un poco entre medias. Antes del paso de bloqueo, se eliminó la actividad peroxidasa endógena incubando durante 8 minutos al 1% de H_2O_2 (Sigma-Aldrich) en metanol (Panreac), se lavó con PBT (PBS y 0,1% de Tx-100) y se bloqueó con 1%BSA y 0,2% Tx-100. Después, en la incubación con primarios, se usó un anticuerpo biotinilado anti-CD11c toda la noche a 4°C. Tras lavar bien con PBT, se aplicó el paso de estreptavidina-peroxidasa al 1% durante 30 minutos. A continuación, se lavaron los cortes con PBT y se añadió la tiramida acoplada a cy3 de un kit comercial (Cyanine 3 Tyramide) disuelto en el tampón proporcionado en el kit según instrucciones indicadas (PerkinElmer) durante 10 minutos. Tras el lavado, las secciones fueron finalmente contrateñidas y montadas en una mezcla de Mowiol/50% DABCO (Sigma-Aldrich).

6. Histoquímica

6.1. Reacción enzimática de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

La actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal), detectable a pH 6,0 (que difiere de la actividad β -galactosidasa ácida lisosomal, presente en todas las células y

detectable a pH 4,0), es un ensayo cromogénico que permite la identificación de senescencia replicativa (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009; Dimri *et al.*, 1995). El protocolo usado en este trabajo siguió las directrices de uno más reciente descrito para cultivos y tejidos (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009) con ciertas modificaciones para adaptarlo a secciones de cerebro de criostato. En este método, se usa un sustrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-3- indol β -D-galactopiranosido (X-gal), el cual forma un compuesto azul insoluble cuando reacciona con la β -galactosidasa.

El procedimiento realizado a partir de tejido procesado en criostato, es el siguiente: Primeramente, se realizó un lavado previo en solución de tinción sin enzima ni dimetilformamida (para remover los restos de PB a pH 6,0). Seguidamente, se realiza la tinción en fresco en una solución con 10 mg/ml de β -gal disuelto en dimetilformamida (Panreac), 40 mM de ácido cítrico/fosfato sódico (Riedl-de Haën; Sigma-Aldrich) a pH 6,0, 5 mM de ferrocianuro potásico, 5 mM de ferricianuro de potasio, 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich) y 2 mM $MgCl_2$ (Riedl-de Haën). Se dejó por último incubando en una estufa a 37°C en oscuridad y cámara húmeda. Para los tejidos usados se monitorizó la tinción que comienza a adquirir una coloración verde pálido a las 2-4 horas, pero sólo empieza a apreciarse diferencias a partir de las 10-12 horas y es máxima a los 2 días. Posteriormente, se lavaron los cortes de tejido con PB 0,1 M para parar la reacción y se montaron con Mowiol (Merck) y DABCO (Sigma-Aldrich) al 2,5 % (v/v) y se almacenaron en oscuridad. Las células senescentes (tonalidad verde-azul) se identificaron mediante microscopía óptica. En algunos casos, se realizó una tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti Iba-1 revelados con anticuerpos secundarios biotinilados y acoplados a la reacción de la peroxidasa.

6.2. Tinción de ácido peryódico de Schiff o leucofucsina (PAS) con hematoxilina

Utilizado tradicionalmente para detectar polisacáridos (concretamente, grupos aldehídos que se crean en sus moléculas durante el proceso de tinción), tiene especial relevancia en un amplio grupo de enfermedades neurodegenerativas por la detección de unas estructuras patológicas descritas como gránulos de PAS (Jucker y Ingram, 1994; Manich *et al.*, 2016; Manich *et al.*, 2013). Esta tinción ha sido propuesta como una tinción de agregados de proteínas A β y ovillos neurofibromatosos de tau (Jucker y Ingram, 1994; Manich *et al.*, 2013). A partir de secciones de criostato secadas a RT durante un mínimo de 24 horas, se procedió a pasar por la cadenas de hidratación de xilol (2 ciclos) y alcoholes (2 ciclos de 100%, 2 ciclos de 96% y el último a 70%), 5 minutos en cada una hasta dejar las muestras en agua. A

continuación, se dejó en ácido peryódico 0.5% durante 5 minutos y se lavó en agua otros 5 minutos. Posteriormente, se pasó a reactivo de Schiff (a 4°C) 15-20 minutos; pasado ese tiempo se volvió a lavar en agua 5 minutos. En nuestros experimentos, se realizó una contratinción con hematoxilina y posteriormente, se aclaró la hematoxilina en alcohol ácido 0,5% (HCl) sumergiendo 3 veces, para dejar en agua otros 5 minutos.

Finalmente, se pasó por la cadena de hidratación, pasando de un 96% de etanol a 2 ciclos de etanol absoluto y xilol, ambos de 5 minutos y se montó con DPX (Sigma-Aldrich).

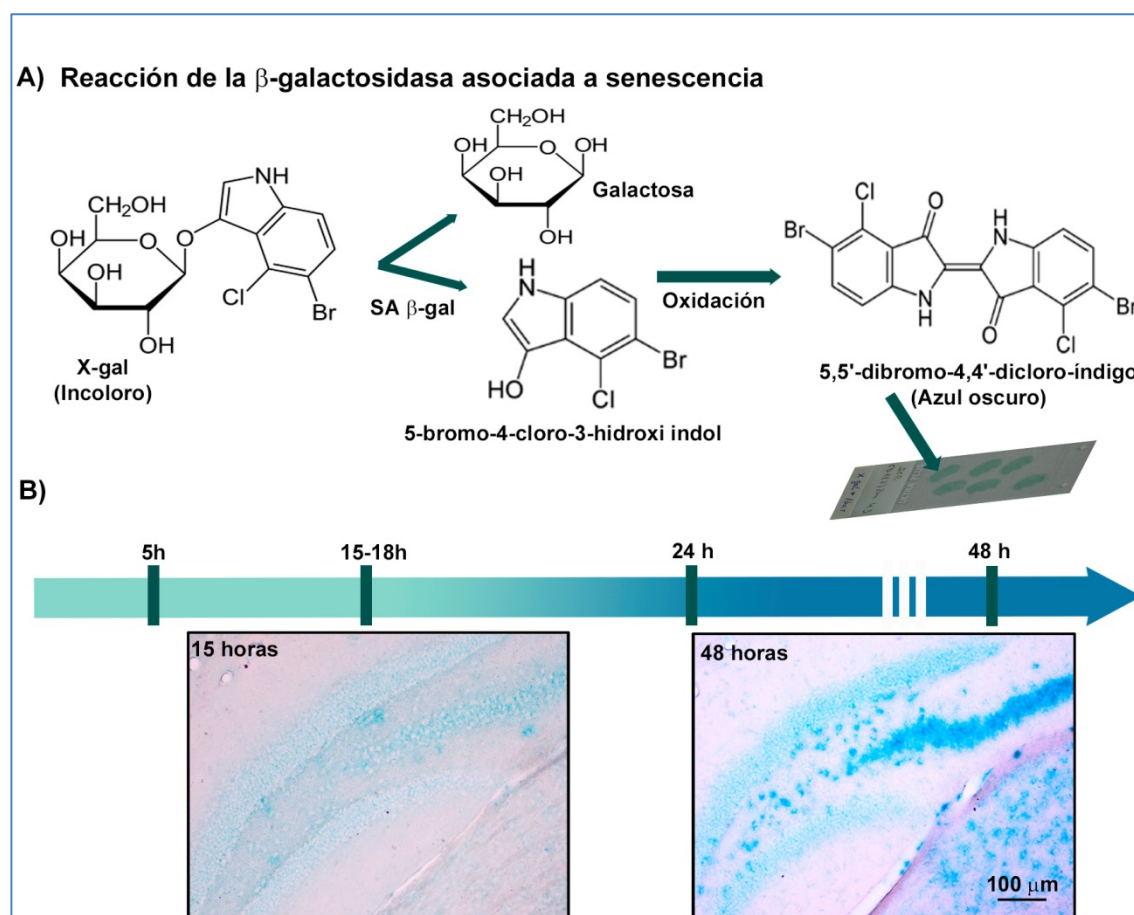


Figura 2. Materiales y Métodos.- Tinción de x-gal asociada a senescencia. A.- Esquema de la reacción catalizada por la β -galactosidasa; se parte del sustrato x-gal (incolore) y como consecuencia de la reacción, la β -gal se une al x-gal y forma: por un lado, la galactosa y por otro lado, 5-bromo-4-cloro-3-hidroxi-indol. Después, es oxidado y forman un compuesto azul que absorbe principalmente entre los 605 y los 665 nm, precipitando en algunas células (Modificado de (Nie y Chen, 2014)). B.- Imágenes representativas de la tinción, mostrando el cambio cromogénico experimentado tras añadir la solución de x-gal en las secciones de criostato (30 μ m de grosor). Los objetivos usados fueron de 20x en un microscopio óptico Nikon Eclipse 50i H550S.

6.3. Tinción de Giemsa

Este método diseñado en un principio para la identificación de parásitos de malaria (Fleischer, 2004), es empleado en histología por la tinción cualitativa de la cromatina y la

membrana nuclear, la metacromasia de algunos de los componentes celulares y las diferencias cualitativas de la tinción citoplasmática dependiendo del tipo celular. En este caso, se usó una variante, tinción de MayGrünwald-Giemsa (MGG), empleada para diferenciar de forma morfológica las células aisladas durante la extracción de microglía, tal como se usó en un estudio reciente para la clarificación de poblaciones mieloides con ligeras modificaciones (Gómez-Perdiguero *et al.*, 2015). Se optó por fijar las células secadas al aire extendidas mediante frotis durante 30 minutos y fijar con PFA 4% durante 20 minutos. A continuación se lava bien en PBS y se da un lavado previo en SS (0,9% NaCl) para ajustar pH. Después, se añade la solución de 50% May-Grunwald (QCA) diluido en agua destilada (v/v) durante 3 minutos. Se lava con 2-3 inmersiones en agua destilada y se añade 14% de Giemsa (QCA) durante 15 minutos. Después, poner a aclarar y dejar 5 minutos en agua destilada MiliQ y secar al aire para montar finalmente con DPX.

7. Inmunohistoquímica

Sobre secciones de criostato previamente secadas durante un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente, se aplica reacciones inmunohistoquímicas siguiendo el mismo procedimiento antes descrito pero con ligeras modificaciones. Antes del paso de bloqueo, se usó un kit comercial ya preparado para bloquear la biotina endógena y se dejaron las secciones 15 minutos lavadas en solución de avidina, seguidos de 15 minutos lavadas en solución de biotina (Vector), dejando escurrir un poco entre medias. Con la incubación con secundarios, se usó un anticuerpo biotinilado (Jackson). Después, se eliminó la actividad peroxidasa endógena incubando durante 30 minutos al 5% de H₂O₂ (Sigma-Aldrich) en metanol (Panreac). Tras lavar bien, se aplicó el kit comercial Vectastain Elite ABC peroxidasa, preparado según instrucciones (Vector) e incubado durante 30 minutos. Por último, se recurre para el revelado al kit comercial de DAB (3,3'-diaminobenzidine) con cloruro de níquel (Vector) que, como consecuencia de la reacción, produce un producto de color gris-negro ante la presencia de la enzima peroxidasa (HRP).

Estudio de expresión génica

1. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total a partir de células aisladas o tejidos diseccionados, se realizó usando el kit comercial TRIzol® (Thermo Fisher). siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Básicamente, las células o los tejidos son centrifugados en un tubo de 1.5 ml. El *pellet* se solubiliza en 500 µl de TRIzol. Una vez que el *pellet* ha sido disgregado homogéneamente con una punta de pipeta p200, se deja 5 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se añaden 100 µl de cloroformo, se agita el tubo enérgicamente y se incuba 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifuga a 16000g en una microfuga Eppendorf 5415-R (Eppendorf) durante 15 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante acuoso, donde se encuentra el RNA a un nuevo tubo al que se añade 500 µl de isopropanol. Se agita y se deja incubar durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se elimina con una punta de pipeta P1000 y el *pellet* de RNA se lava con 500 µl EtOH 70% a -20°C. Se centrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos a 4°C en la minifuga. Finalmente, se elimina el EtOH, el *pellet* se deja secar a temperatura ambiente hasta que no queden restos del alcohol, y se resuspenden en un volumen de 10 a 20 µl de H₂O libre de RNasa.

La cantidad de RNA total se determinó mediante un espectrofotómetro BioDrop µLITE (Biodrop) midiendo la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀). La calidad del RNA de las muestras se determinó cualitativamente mediante la medida de la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y 280 (A₂₈₀), de forma que el cociente de A₂₆₀/A₂₈₀ fue de 1,8 a 2,00 en todas las muestras analizadas.

2. Cuantificación relativa por PCR cuantitativa (RT-qPCR)

1 µg RNA total se retrotranscribe a ADN complementario (cDNA) en un volumen final de 20 µl utilizando la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen). La reacción de RT consiste en un primer ciclo a 65°C durante 5 minutos, seguido de otro ciclo a 25°C de 10 minutos. A continuación se le añade la transcriptasa reversa (1 µl de transcriptasa reversa MMLV (Vf3= 20µl)), pasa a un último ciclo a 37°C durante 50 minutos (o 42°C, 1h) y un segundo ciclo a 70°C durante 15 minutos. Se siguieron las instrucciones de uso excepto para el uso de 300 ng de hexámeros y 4 unidades de *RNasa OUT* (Invitrogen) por cuanto de reacción.

El cDNA obtenido, se utilizó para analizar los genes recogidos en la Tabla 3, utilizando los cebadores indicados con una PCR cuantitativa (Q-PCR) en placa mediante 7500 *Fast Real-Time PCR System*, usando el sistema *Fast SYBR® Green system* (Thermo Fisher). Cada 15 µl de volumen de reacción incluyó 10 ng cDNA y 0.5 µM de cada *primer*.

Las secuencias de los cebadores, fueron obtenidas mediante el análisis de la secuencia

del gen en el programa 7500 (Applied Biosystems) para obtener temperaturas de fusión (T_m) en torno a los 58°C en las parejas de cebadores.

Tabla 3. Materiales y Métodos.- Mouse Primers usados para q-PCR

| Nombre | Alternativo | Secuencia 5'-3' |
|---------|-------------------------|--|
| Actin | | GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC |
| Clec9a/ | Dngr-1 | AGACTGCTTCACCACTCCAA CTTGGCACAATGGACAAGGT |
| Baft 3 | | CAGACCCAGAAGGCTGACAAG CTGGCAGCACAGAGTTCTC |
| Id2 | | ATGAAAGCCTTCAGTCCGGTG AGCAGACTCATCGGGTCGT |
| IRF-8 | | TGCCACTGGTGACCGGATAT GACCATCTGGGAGAAAGCTGAA |
| CD80 | B7-1 | ACCCCAACATAACTGAGTCT TTCCAACCAAGAGAAGCGAGG |
| CD103 | ITGAE | CCTGTGCAGCATGTAAAAGAATG CAAGGATCGGCAGTTCAGATAC |
| Iba-1 | | GGACAGACTGCCAGCCTAAG GACGGCAGATCCTCATCATT |
| TNF-α | | TGGAAGTGGCAGAAGAG CCATAGAACTGATGAGAGG |
| IL-6 | | GAGGATACCACTCCCAACAGACC AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA |
| IL-1β | | CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG GATCCACACTCTCCAGCTGCA |
| CX3CR1 | Receptor de fractalkina | TCAGCATCGACCGGTACCTT CTGCACTGTCCGGTTGTTCA |
| CCL2 | | CGGAACCAAATGAGATCAGAACCTAC GCTTCAGATTTACGGGTCAACTTCAC |

Los cebadores fueron diseñados en distintos exones para evitar la amplificación del ADN genómico contaminante en las muestras. Los amplicones obtenidos fueron siempre menores de 150bp. Se aplicaron las siguientes condiciones de PCR de la mezcla para *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher) e indicado en la Tabla 4:

1. Desnaturalización durante 20 segundos a 95°C.
2. Amplificación durante 3 segundos a 95°C, seguido de 30 segundos a 60°C para la mayoría de los casos, modificándose la T_m en caso necesario y extensión a 72°C. Este proceso se repite durante 40 ciclos.

3. Curva de disociación de la pareja de cebadores, manteniendo muestras a 95°C durante 15 segundos a 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos. Por último, a 60°C durante 15 segundos. El gen 36B4 de ratón fue usado como control interno para normalizar la variación de cantidad de RNA. La cantidad del mRNA diana en las muestras fue estimada por el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 4. Materiales y Métodos.- Condiciones de la q-PCR

| Etapas de desnaturalización (1 ciclo) | |
|--|--------------------|
| Paso 1 | 95 °C, 20 segundos |
| Etapas de amplificación (40 ciclos) | |
| Paso 1 | 95 °C, 3 segundos |
| Paso 2 | 60 °C, 30 segundos |
| Curva de disociación (2 ciclos) | |
| Paso 1 | 95 °C 15 segundos |
| Paso 2 | 60 °C, 60 segundos |
| Paso 3 | 95 °C, 15 segundos |
| Paso 4 | 60 °C, 15 segundos |

Por último, para ver la expresión de *Dngr1* en tejido, se realizó una PCR semicuatitativa de varias regiones del cerebro y del bazo (spleen) con el kit AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems), usando 5 ng de cDNA total y 1 µM de primers (Tabla 3). Las muestras de bazo fueron diluidas 1/30 relativo a las muestras originales para evitar saturación de la imagen.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el software *GraphPad Prism* 6.0. En primer lugar, como requisito para un ajuste paramétrico o no, se determinó la normalidad y varianza de muestras. Se calculó si la distribución era normal, típica de población natural mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* (1933; 1948) y, por otro lado, se corroboró la homogeneidad de varianzas con el test de *Levene* (1960). Para la determinación de la significancia de las diferencias entre las medias, se usó un ajuste paramétrico y se aplicó la prueba de la *t* de *Student* con 1 o 2 colas, según fueran muestras pareadas o no. Para las situaciones que incumplen requisitos y en donde las comparaciones se tienen que realizar entre valores relativos, se utilizó la transformación a *arcsen* (raíz (valor)) antes de aplicar el test de *t* de *Student* (Chacón *et al.*, 2015).

En este estudio, se ha considerado como significativo una probabilidad $p < 0,05$. Las probabilidades se han representado como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Los datos están representados como medias \pm SEM de un número de experimentos (n) indicado en cada clase.

Obtención de Imágenes

1. Microscopio óptico

Las imágenes de los marcajes con DAB o X-gal de histoquímica, como las de Giemsa de citoquímica, se tomaron empleando un microscopio óptico Nikon Eclipse 50i H550S, usando objetivos de 4, 10x, 20x, 40x y 100x INM para imágenes de detalle). Las imágenes fueron tomadas con ayuda del software *NIS elements*.

Para contajes manuales de células Iba-1 positivas en secciones de cerebro e Iba-1-MCH II positivas, se hicieron a un aumento de 20x (40x INM para asegurar positivos) usando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Imager A1). Las imágenes fueron preprocesadas para ver co-localización con ayuda del software *AxioVision 4.x*.

2. Microscopía Confocal

Las imágenes de inmunofluorescencia fueron adquiridas con un microscopio confocal invertido *Leica Spectral TCS SP5* (Leica Microsystems).

2.1. Mapas del cerebro (imágenes solapadas)

Los mapas de todo el cerebro fueron tomados usando un objetivo 20x INM y 1,7x de zoom digital. La captura en z (*z-stack*) para las imágenes de proyección máxima a confocal de cortes histológicos se realizó cada 4 μm , usando una resolución de 500 x 500 píxeles.

Sin embargo, para mapas de regiones pequeñas como hipocampo y plexos coroideos, fueron adquiridas usando un objetivo de 40x INM y 1,7x de zoom digital y la captura en z cada 2 μm , usando la misma resolución. Se procedió así a un mapeo que abarcó todo el área ocupada por hipocampo, incluyendo las áreas de CA1 y CA3 de la formación hipocampal y el giro dentado del Hipocampo dorsal (Figura 3 A), permitiendo realizar recuentos de toda la región de interés presente en cada corte.

2.2 Imágenes estándar

Se mantiene el objetivo de 40x INM pero con capturas cada 1 μm de grosor, a 1024 x 1024 píxeles de resolución. Para detalles, se usa un objetivo de 63x con zoom digital de 3x y capturas cada 0,5 μm de grosor (para reconstrucciones 3D, se usaron cada 0,25 μm). Las excepciones se indican en el pie de cada figura. Las imágenes son presentadas como el promedio de todas las proyecciones máximas y manteniendo los parámetros constantes, usando controles negativos (secciones teñidas sin el anticuerpo primario pero con el secundario para identificar fluorescencia de fondo no específica). De las capturas en z fue eliminado el fondo con ayuda del software *Leica LAS AF 2.6.3*, posteriormente procesadas y analizadas usando *Adobe Photoshop CC* (Adobe Systems) e *ImageJ* (Rasband, 1997-2016) para cuantificación de las regiones de interés o ROI (*Region of interest*) y conteo celular. Para reconstrucción 3D, se usó el *plugin 3D viewer para ImageJ*.

Análisis de imágenes

1. Estereología en regiones de hipocampo

Para contar el número de células de microglía, así como para los análisis de su morfología, se procedió a la reconstrucción del hipocampo, el hipocampo dorsal (HCd) en concreto (Figura 3).

Para ello, en cada contabilización celular se emplearon de 4-6 cortes consecutivos de una misma serie. De este modo, en el caso de los cortes generados con criostato se analizó un corte cada 300 μm , cubriendo un total de unos 1500 μm aproximadamente. Para seleccionar esos 5 cortes de cada serie, se establecieron criterios estructurales que nos permitieron dar resultados normalizados para poder comparar entre animales de distinta edad y fondo genético. Algunos de los cortes consecutivos de la misma serie fueron teñidos con H&E para poder discernir mejor las estructuras de referencia.

En el caso del HCd, el área de análisis comenzó, en un sentido anteroposterior, desde la aparición del brazo ventral del giro dentado del hipocampo hasta el final del HCd; de media ocupaba el análisis de 5-6 cortes por cerebro, abarcando las regiones aproximadas de -1,28 mm a -2,80 mm de Bregma (Paxinos y Franklin, 2004); Figura 3 A.

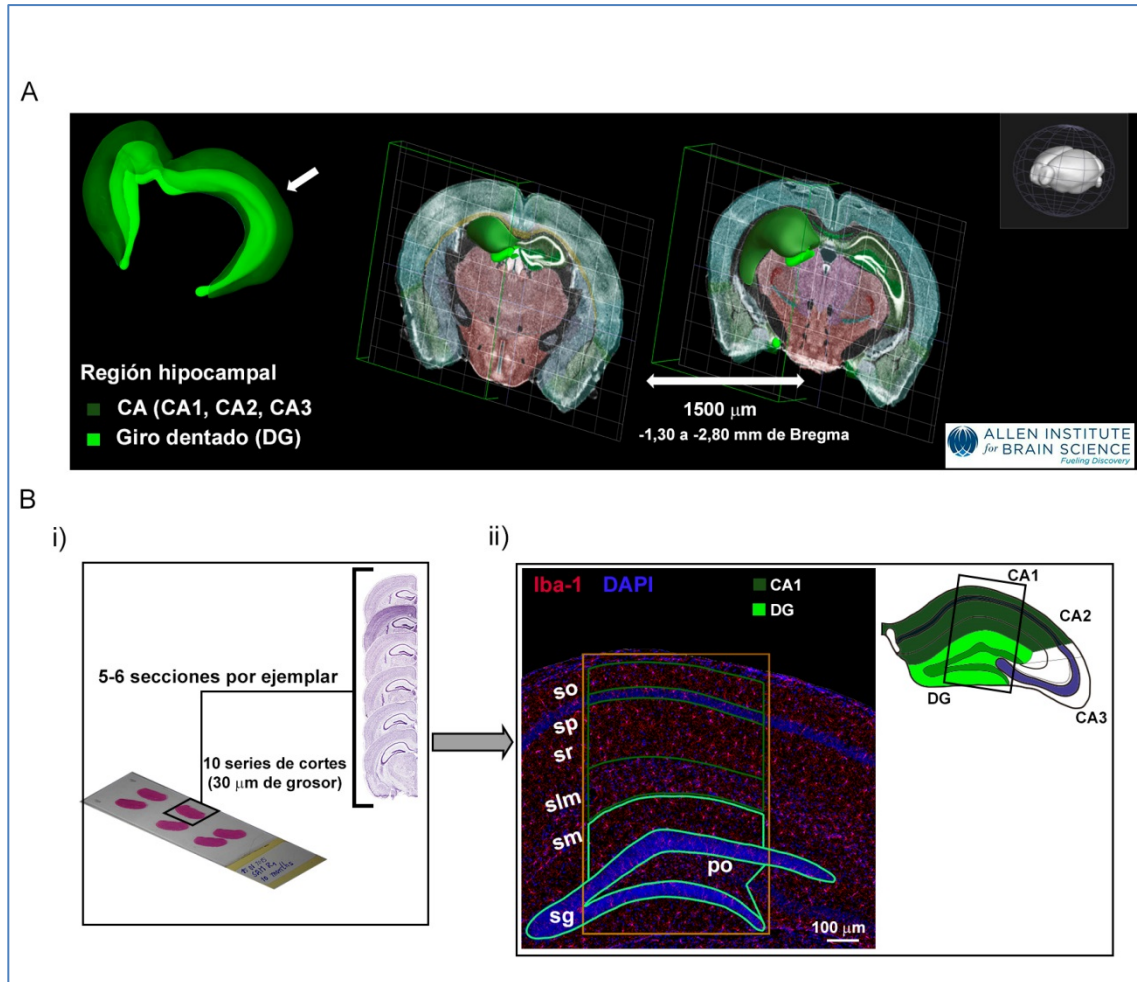


Figura 3. Materiales y Métodos.- Reconstrucción tri-dimensional del hipocampo. Procedimiento estereológico para cuantificar células Iba-1⁺ en hipocampo (Por ejemplo CA1). A) Región del hipocampo usado para análisis de estereología (Modificado de *Brain Allen Atlas*, (Allen Institute for Brain Science, consultado en 2016-2017), indicando a qué alturas se realizó la reconstrucción del HCd (Paxinos y Franklin, 2004). B) Reconstrucción del hipocampo. Las secciones de criostato coronales consecutivas fueron obtenidas (30 μ m de grosor) tal como es descrito en (Díaz-Moreno *et al.*, 2013). Cada porta contiene una reconstrucción rostro-caudal de 6 secciones de cerebro separadas 300 μ m entre ellas (Series de 10 regiones), indicado en panel i) del apartado B. Mapa representativo del hipocampo usado para evaluar con *ImageJ* (B, panel ii). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul); los macrófagos/microglía del cerebro se tiñeron usando Iba-1 (Wako). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5. Los mapas cerebrales en hipocampo para evaluar la densidad de la microglía fueron tomados usando un objetivo de 40x y un zoom digital de 1.7x. Las áreas usadas en la cuantificación de Iba-1⁺ están rodeadas de cuadros verdes, diferenciándose en CA1 y DG (B, panel ii). so, estrato oriens; sp, estrato piramidal; sr, estrato radiado; slm, estrato lagunoso-molecular; mo, estrato molecular; po, capa polimórfica; sg, capa granular. CA1, *cornu ammonis* 1; CA3, *cornu ammonis* 3; DG, giro dentado.

Para calcular el número de células Iba-1 positivas por estructura, se llevó a cabo el sumatorio de los valores obtenidos de los 5 cortes analizados (Figura 3 B, panel i) y se normalizó por el número de series obtenidas (5 en el caso del HC).

Para los recuentos manuales de células positivas de Iba-1⁺-MHC II⁺, se realizaron a partir de la emergencia del SVZ, definido rostralmente por el límite anterior del cruce del cuerpo calloso (Ferrón *et al.*, 2007) y cuando se comienza a visualizar plexos coroideos de ventrículos

laterales y tercero (VL y 3V), en un área comprendida entre 1,70 mm—2,92 mm de Bregma. Los recuentos de las diferentes densidades de población marcadas se realizaron con ayuda de *ImageJ*. Por último, para recuentos manuales de células Iba-1⁺ formando un clúster se realizó un recorrido por secciones de todo el cerebro desde 1,10 a - 4,5 mm de Bregma. Consideramos como clúster a toda agrupación de células solapadas, perdiendo su morfología individual.

3. Evaluación de la morfología

3.1 Caracterización visual manual

Las imágenes fueron cogidas en las zonas CA1 del hipocampo y en la corteza entorrinal. Las tinciones de células Iba-1⁺ se visualizaron con un objetivo de 40x y zoom 1,7x mapas del hipocampo. Las células Iba-1⁺ fueron clasificadas morfológicamente de forma cualitativa en base a criterios publicados recientemente para animales y humanos envejecidos, frente al habitual usado de Kreutzberg *et al.* (Bachstetter *et al.*, 2015; Karperien *et al.*, 2013; Perez-Pouchoulen *et al.*, 2015; Torres-Platas *et al.*, 2014).

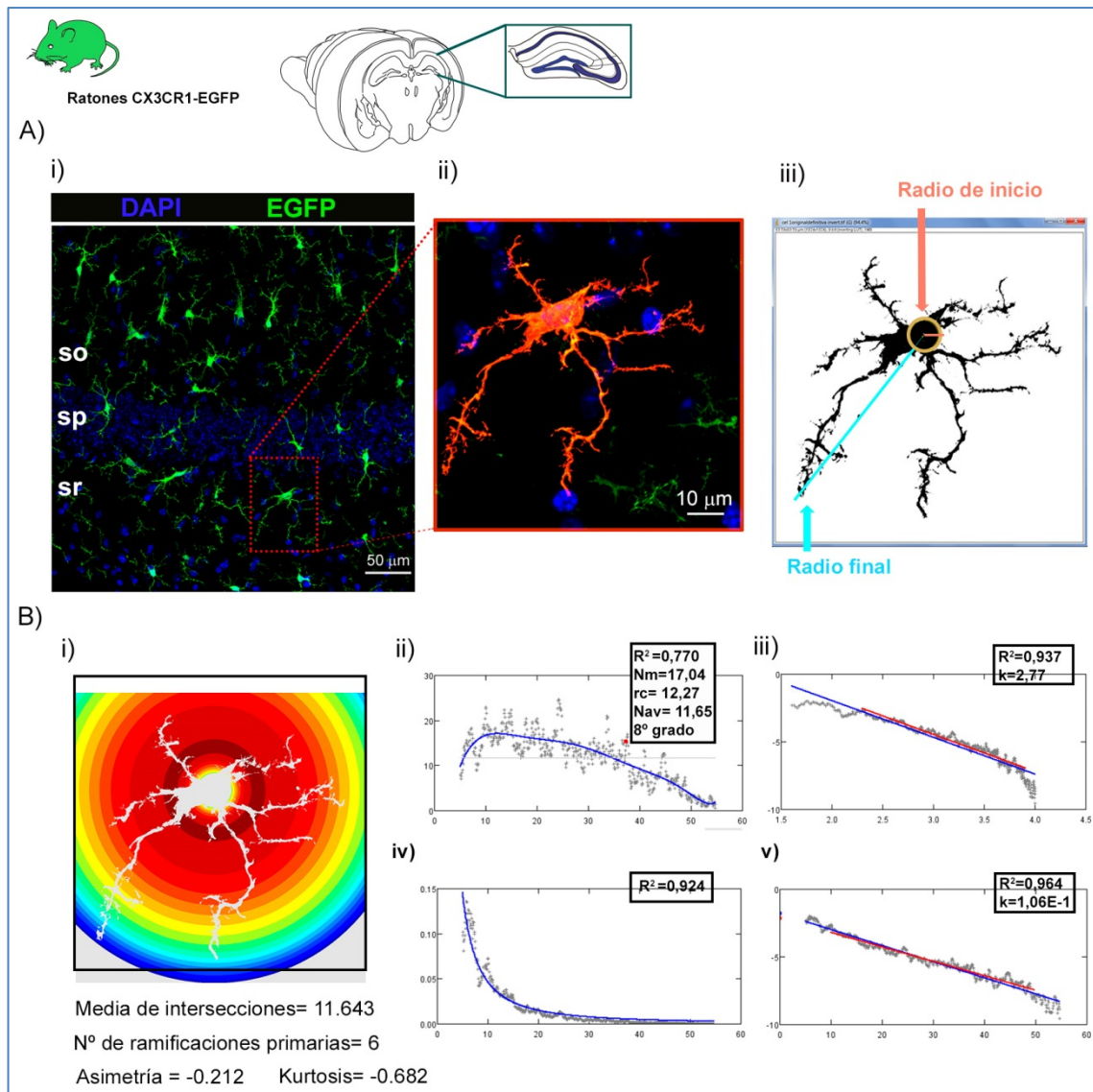


Figura 4. Materiales y Métodos.- Análisis de morfología mediante análisis de Sholl. Imagen representativa de un mapa del hipocampo de ratón CX3CR1-EGFP, mostrando las regiones usadas para el análisis (A, panel i) y una captura en detalle de la morfología de la célula (A, panel ii). Imagen en binario de la proyección máxima de la imagen de detalle (A, panel iii). En ella se indica el radio del proceso de mayor longitud que corresponde al radio del círculo concéntrico más grande y alejado del soma (*ending radius* o radio máximo) y el radio que abarcaría el soma (*starting radius* o radio inicial). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul); los macrófagos/microglía del cerebro fueron tomados aprovechando la fluorescencia directa de las células EGFP de los animales CX3CR1 (verde) en este caso. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5. Los mapas cerebrales de la figura para evaluar la densidad de la microglía fueron tomados usando un objetivo de 40x y un zoom digital de 1,7x, mostrando imágenes de detalle a 63x de una célula EGFP positiva. (B) Ejemplo del resultado arrojado en el análisis de Sholl (paneles i-v). Región reconocida por el software de análisis (B, panel i), donde se marcan los diferentes círculos concéntricos. En ii-v se indican los 4 métodos usados para el análisis: lineal (i), normalizado (ii), semilogarítmico (iii) y logarítmico (iv). Abreviaturas: so, estrato oriens; sp, estrato piramidal; sr, estrato radiado.

3.2. Análisis de Sholl aplicado a la microglía

La cuantificación de la morfología de las células se realizó contando el número de intersecciones de los procesos celulares con los círculos concéntricos mediante el análisis de Sholl (Sholl, 1953) (Figura 4B, panel i). En este caso, se utilizó un método basado en los adaptados para analizar microglía (Baron *et al.*, 2014; Catalin *et al.*, 2013) y sobre imágenes de bits (Figura 4 A, panel i-ii) en 2 dimensiones (Ferreira *et al.*, 2014). Primero se realizó en secciones de hipocampo de ratones CX3CR1-GFP, aprovechando la fluorescencia directa de GFP y con el objetivo de poner a punto el método y, a continuación, sobre cortes de ratones SAM, usando Iba-1 como marcador.

Para ello, primero se partió de proyecciones en z de la imagen tomada con el microscopio confocal invertido (Figura 4B, panel ii) para asegurar que se eligieron células completas y se descartaron células mal cogidas o con artefactos. A continuación, se identificaron sobre la imagen de proyección máxima y se pasó a escala de grises la proyección en z para realizar un preprocesado, eliminando ruido y elementos celulares que no pertenezcan a las células identificadas anteriormente. A continuación, se pasó a imagen binaria estableciendo un criterio arbitrario pero constante de fondo de marcaje. Las imágenes se calibraron a escala de micras y, por último, se usó el plugin de análisis de Sholl marcando un radio desde el centro del soma hasta el final del proceso de mayor longitud de la célula que se fija como radio máximo o *ending radius*, coincidiendo con el radio del círculo concéntrico más grande trazado para esa célula (Figura 4, panel iii).

Para todas las células, se especifica el mismo radio de inicio o *starting radius* a partir del cual el software no considera como soma (5µm de radio), margen entre los radios de círculos concéntricos (cada 0,382 µm, ensayado sobre varios diámetros) y los número de réplicas del análisis (3 por intersección), especificando el número de ramificaciones primarias para cada célula en cada caso. Las células se analizaron bajo 3 métodos: normalizado, semilogarítmico y logarítmico (Figura 4B, paneles ii-v).

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de células mieloides en el cerebro sano

Como hemos mencionado en la Introducción, las células mieloides en el SNC representa una clase heterogénea de células del sistema inmune innato que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis en los tejidos durante el desarrollo y la edad adulta (Ajami *et al.*, 2011; Butovsky *et al.*, 2012; Ginhoux *et al.*, 2010; Gómez-Perdiguero *et al.*, 2015; Prinz *et al.*, 2017). Su papel en la fisiología y patología del cerebro no se conoce completamente en la actualidad.

El primer objetivo de esta tesis ha sido el aislamiento y caracterización de las diferentes subpoblaciones de células mieloides en el cerebro sano de ratones adultos. Para ello, nos hemos servido del uso de ratones transgénicos que nos permite visualizar las distintas subpoblaciones de células mieloides y un seguimiento adecuado de su purificación, seguido de la caracterización de las células con marcadores específicos mediante análisis por citometría de flujo.

A diferencia del cerebro embrionario o postnatal temprano de ratón, en el cerebro adulto de los mamíferos existe gran cantidad de mielina; una estructura multilaminar de naturaleza lipoproteica que rodea los axones de la neurona. Uno de los retos más importantes en la caracterización de las células del cerebro es precisamente su purificación. Para el aislamiento de células de la masa cerebral se llevaron a cabo protocolos basados en gradientes discontinuos de Percoll, tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Estos gradientes han sido aplicados para aislar varios tipos celulares en el cerebro (neuronas y oligodendrocitos) y orgánulos subcelulares, así como para el aislamiento de microglía y leucocitos (Cardona *et al.*, 2006; Pino y Cardona, 2011). El protocolo desarrollado en este trabajo es una modificación del método descrito por Cardona *et al.* (2006); (London *et al.*, 2013) y ha sido publicado por nuestro grupo (Quintana *et al.*, 2015).

1. Visualización de células mieloides en parénquima cerebral, meninges y plexos coroideos

1.1. Expresión de células CSF1R-EGFP positivas en el cerebro de ratón sano

En primer lugar, para visualizar y estudiar la localización de las células mieloides en el cerebro, hemos utilizado el ratón c-fms-EGFP/Csf1r-EGFP (Sasmono *et al.*, 2003). El gen c-fms

(Figura 1A) codifica para el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF1R/CD115), el cual se expresa en cerebro en células que tienen un origen mieloide (Sasmono *et al.*, 2003). Será referido a partir de ahora como ratones Csf1r-EGFP. Los cerebros de estos ratones sanos de 4 y 10 meses (m), se fijaron y extrajeron como se indica en el apartado Materiales y Métodos. Las secciones coronales de los cerebros cortados en criostatos fueron evaluadas mediante microscopía confocal para la visualización de la proteína EGFP. Uno de los objetivos de este trabajo fue caracterizar con mayor detalle la morfología y localización de estas células mieloides del cerebro que no se corresponden con las células de microglía propiamente dichas y que cuando comenzó este trabajo no habían sido muy estudiadas (Prinz *et al.*, 2017).

En la visión general del mapa se observa que las células CSF1R-EGFP⁺ mantienen una estructura muy organizada, dando una apariencia de compartimentalización y regionalización del entorno cerebral, tal como se describieron en los trabajos de (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005). En cambio, las células CSF1R-EGFP⁺ del resto de las localizaciones, presentan en general una forma más ameboide, con menor ramificación y procesos cortos y engrosados (Figura 1B, panel b, c y d).

En la Figura 1B, mostramos que las células CSF1R-EGFP⁺, presentes en el cerebro de ratón en homeostasis, pueden diferenciarse en cuatro categorías que se diferencian en su localización y/o morfología tal y como se había descrito anteriormente (Prinz y Priller, 2014) (Figura 2 Introducción):

1. Las **células de microglía**: (Figura 1B, panel a) son las células situadas en el parénquima cerebral (BP). La microglía son las células inflamatorias del SNC descritas por Del Río-Hortega (1919) y actualmente se consideran como los macrófagos residentes del cerebro (Aguzzi *et al.*, 2013; Greter *et al.*, 2015).
2. **Macrófagos de las meninges** (m) (Figura 1B, panel b), situados en las leptomeninges y en concreto en la piamadre (o membrana pial), la membrana meníngea interna en contacto con el SNC (encéfalo y médula espinal).
3. **Macrófagos de los plexos coroideos** (Figura 1B, panel c), situados en los plexos coroideos (Ch). Los Ch es una parte del sistema nervioso central en el cerebro y se compone de capilares, ventrículos y células endoteliales. El Ch está encargado de producir el líquido cerebroespinal (o cefalorraquídeo) que sirve de protección al SNC.
4. **Macrófagos perivasculares** (Figura 1B, panel d), situados en los espacios perivasculares de los vasos sanguíneos que riegan el cerebro.

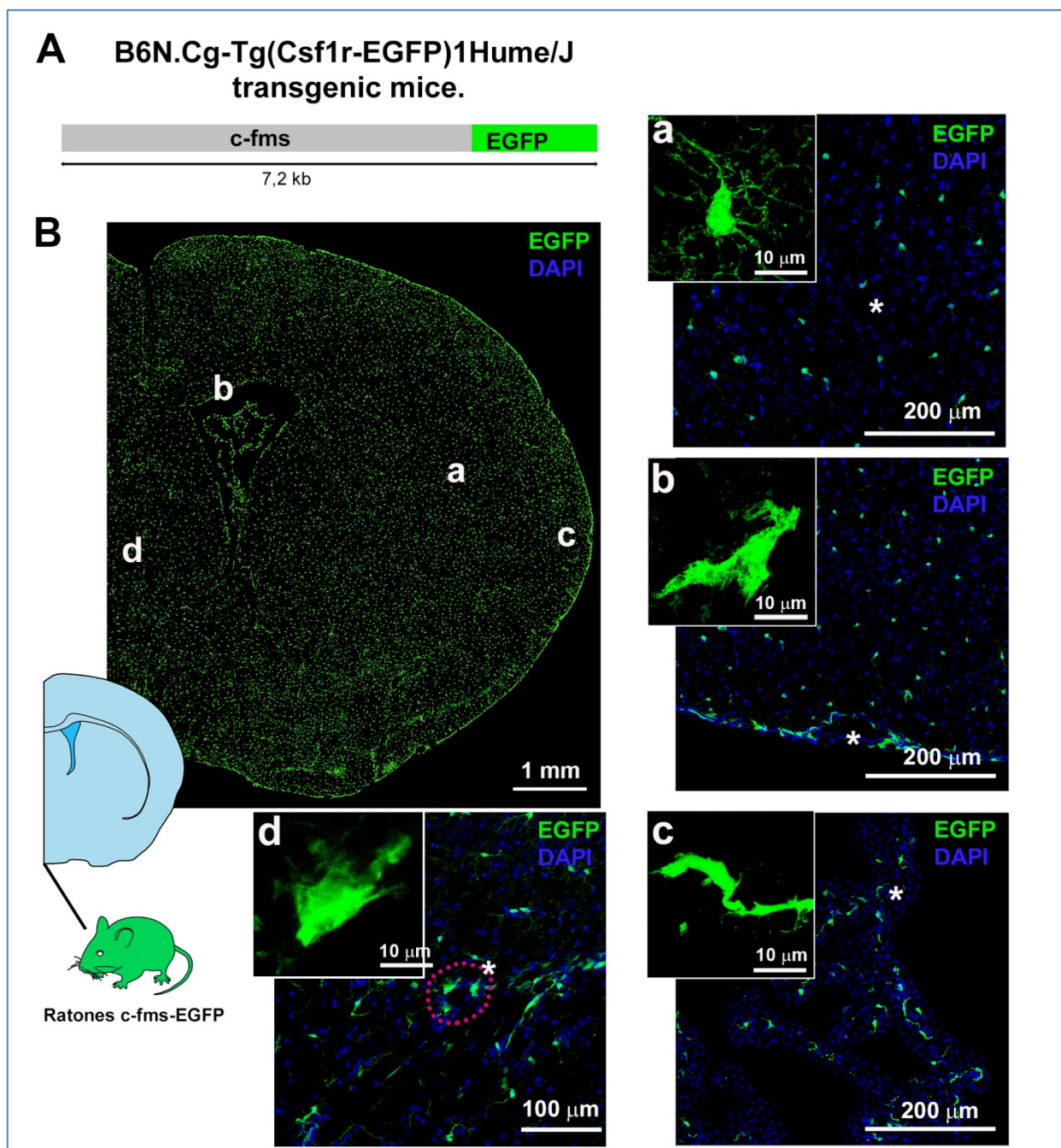


Figura 1. Resultados.- Expresión de EGFP en ratones transgénicos B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP) 1Hume/J. (A) Construcción del ratón transgénico csf1r/fms-EGFP. El gen c-fms codifica para el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF1R/CD115), que en cerebro se expresa sólo por células de origen mieloide. (B) Fluorescencia directa de secciones coronales de cerebro del ratón adulto csf1r/fms-EGFP, mostrando células EGFP positivas (con objetivo 20x y zoom digital 1.7x). La fluorescencia directa de EGFP es vista en verde y los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Los paneles a-c muestran las imágenes a 40x (zoom digital 1.7x) de mapas cerebrales de subregiones del cerebro, marcando con * las células ampliadas, usando un objetivo de 63x (zoom digital 3x): (a) parénquima del cerebro; (b) plexos coroideos; (c) células EGFP positivas en membranas menígeas y (d) vasos sanguíneos para mostrar macrófagos perivascuales. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido SP5 Leica TCS. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes. Las capturas son imágenes representativas de un experimento de n=4 ♂.

Como se muestra con más detalle en la Figura 1B en las ampliaciones (paneles a-d), las células mieloides vistas a microscopio confocal presentan una gran diversidad de morfologías según su ubicación en el cerebro. Las células CSF1R-EGFP⁺ situadas en el BP (Figura 1B, panel a) tienen un soma pequeño con ramificaciones largas y extendidas, formando un entramado homogéneo y abarcando todo el parénquima sin solaparse los procesos con células vecinas.

Para el estudio de las células CSFR1-EGFP⁺ situadas en la piamadre, se usaron cortes horizontales de 80 µm de los primeros 200 µm de la región apical de los hemisferios cerebrales de los ratones Csf1r-EGFP, tal como se indica en el apartado Materiales y Métodos y Figura 2A, panel i. Se seleccionaron cortes de las regiones que abarcaban la piamadre y glía limitante, y sobre ellas se analizaron las células por microscopia confocal para la visualización de las células y la reconstrucción tridimensional y los mapas para su posterior conteo. Como se muestra en la Figura 2A, panel ii y iii, se observó una densa red de células CSF1R-EGFP⁺, similares en morfología a las células CD11b⁺ (OX-42) previamente descritas en la piamadre de rata (McMenamin, 1999; McMenamin *et al.*, 2003).

Para saber si estas células se encontraban en la parte exterior o en el interior del parénquima cerebral, se realizó una tinción con un anticuerpo que reconoce la proteína fibrilar ácida glial (GFAP). El GFAP es un marcador de astrocitos (Hol y Pekny, 2015) expresado en la glía limitante. La glía limitante es la fina capa formada por los pies de los procesos de los astrocitos que están asociados a la lámina basal del parénquima; y que junto con las células endoteliales de los vasos cerebrales, forman parte de la BHE (Abbott *et al.*, 2006; Bechmann *et al.*, 2007; Coureuil *et al.*, 2017; Perry y Teeling, 2013). Como se muestra en la Figura 2A, panel iii, las células CSF1R-EGFP⁺ constituye una barrera de células situadas en la membrana meníngea por encima del área de células GFAP⁺. Por lo tanto, se observa claramente que las células mieloides CSF1R-EGFP⁺ con una morfología ameboide, están situadas en el exterior del encéfalo, imbuidas en la membrana meníngea y por fuera de vasos sanguíneos (Figura 2C).

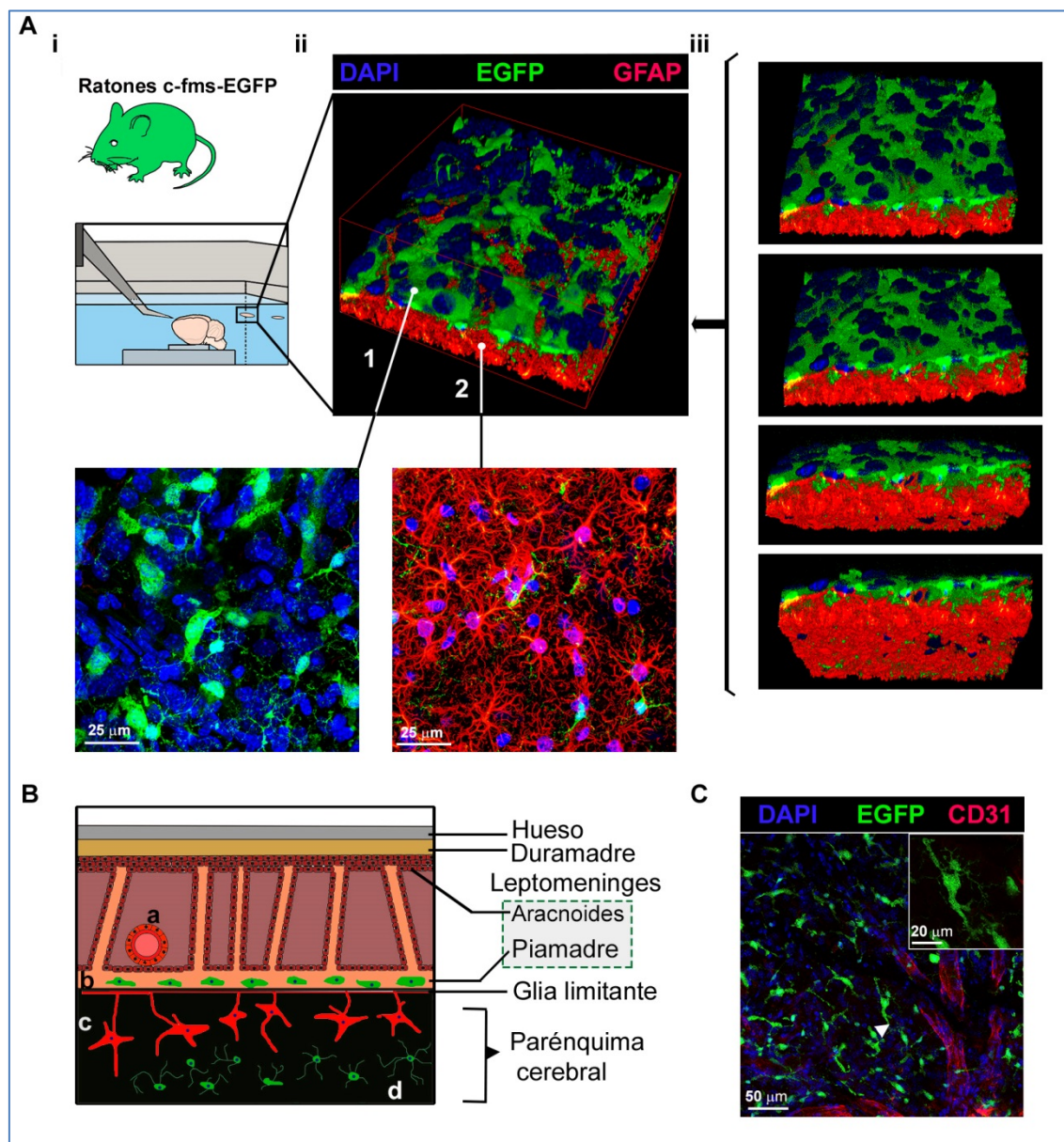


Figura 2. Resultados.- Reconstrucción tridimensional de imágenes de confocal de las células mieloides de la meninges en ratones transgénicos B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP) 1Hume/Js. (A) Se muestra la reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de confocal a 63x de secciones de 80 μ m horizontales en vibratomo (panel i) que contienen la piamadre de las meninges y parte de parénquima cerebral (indicado como 1 y 2 respectivamente) de ratones Csf1r-EGFP (Panel ii y iii). Las secciones fueron teñidas con GFAP que reconoce astrocytos (en rojo); la fluorescencia de EGFP de las células mieloides fue visualizada de forma directa (verde), mientras que los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las series en z (0.30 μ m, 63x, 62 μ m en Z) fueron también adquiridas por microscopia confocal y procesado con *ImageJ*, mediante el *plugin high-level 3D visualization framework*. (B) Ilustración de las meninges; la membrana pial o piamadre está íntimamente adherida a la superficie del encéfalo y médula espinal, siguiendo todas sus concavidades y convexidades. Entre piamadre y aracnoides se localiza el espacio subaracnoideo que contiene una red filamentosa de hebras (trabéculas) de tejido conectivo y está atravesado por numerosas arterias y venas. La piamadre está separada del parénquima cerebral por la glía limitante, constituida por una delgada barrera formada por los pies astrocitarios y asociada con la lámina basal del parénquima que rodea el cerebro y médula espinal. (Crossman y Neary, 2007). (C) Captura de imagen de meninges a 40x, mostrando el marcaje de las células mieloides EGFP positivas (verde) y de vasos sanguíneos con CD31 (en rojo); los núcleos van teñidos con DAPI (azul). Los recuadros muestran capturas a 63x (digital zoom 3x) de las células marcadas con una flecha. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 Leica TCS. Las barras de escala están incluidas en cada imagen. a, vaso sanguíneo; b, piamadre; c, glía limitante y d, microglía (BP).

RESULTADOS

El análisis de las células EGFP⁺ situadas en el resto de las localizaciones se muestran en la Figura 3 y 4. Los macrófagos de los plexos y perivascuales están en íntimo contacto con los vasos sanguíneos. Para una mejor localización, teñimos los cortes cerebrales con el marcador CD31. CD31, también conocido como PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule), es utilizado en inmunohistoquímica como un marcador de células endoteliales (Liu y Shi, 2012; Pisacane *et al.*, 2007). En la Figura 3A, mostramos un esquema del plexo coroideo, en el que se observa que las células epiteliales se encuentran en contacto con las células endoteliales (CD31⁺).

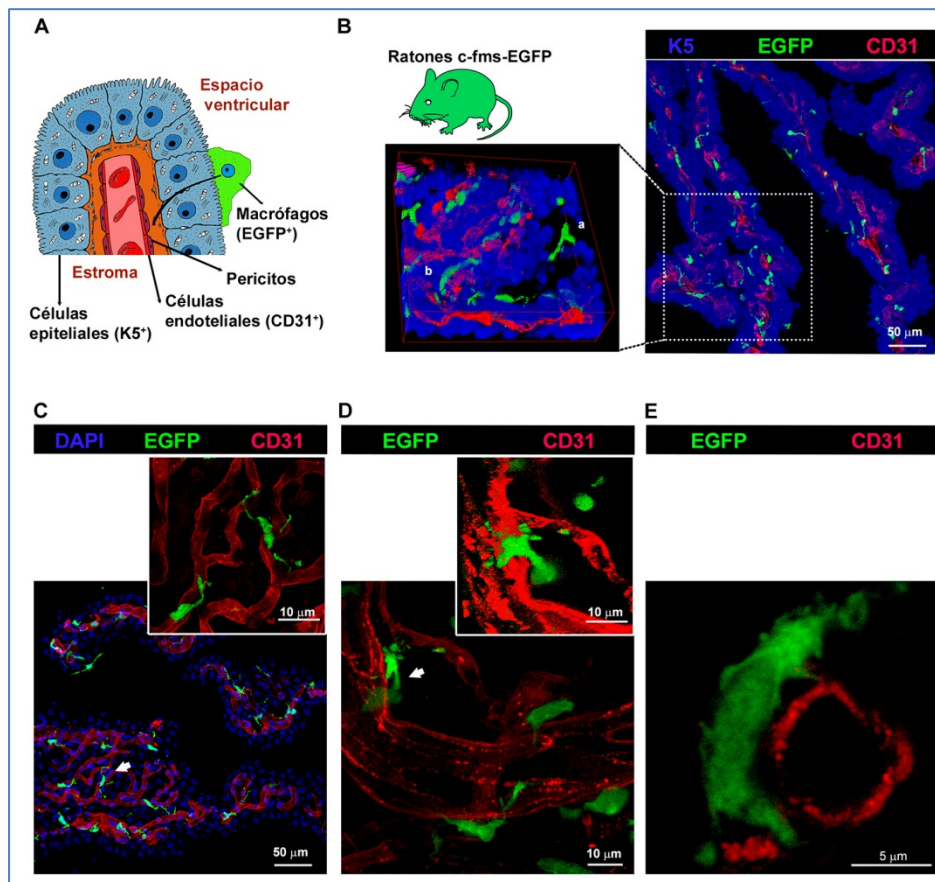


Figura 3. Resultados.- Expresión de EGFP en los plexos coroideos de ratones transgénicos B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP) 1Hume/J. (A) Ilustración de un plexo coroideo, indicando la situación de las células mieloides cerca del endotelio vascular o por fuera del epitelio que recubre los plexos coroideos, modificado de (Meeker *et al.*, 2012). (B y C) Imágenes a 40x de células EGFP y CD31 positivas en el plexo coroideo. El recuadro en el panel B muestra una reconstrucción 3D a partir de imágenes en confocal a 63x (zoom digital 3x) de la región señalada sobre la imagen a 40x en línea discontinua. El recuadro en C muestra una ampliación a 63x de las células señaladas con la fecha blanca. (D) Detalle a objetivo 63x con zoom 5x de células mieloides en íntimo contacto con vasos sanguíneos del plexo coroideo. El recuadro ofrece una reconstrucción 3D de la célula mieloide indicada con la flecha blanca a partir de las imágenes en z. (E) Detalle de una sola captura en z en el microscopio confocal a 63x con zoom 8x de un plexo coroideo, mostrando una células EGFP⁺ (en verde) rodeando a las células endoteliales CD31⁺ del vaso sanguíneo (en rojo). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 TCS a partir de secciones de criostato de 30 μm de grosor. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul); las células mieloides son visualizadas con la fluorescencia directa de EGFP (verde); células positivas para CD31, que marcan vasos sanguíneos (rojo) y las células del epitelio de plexos coroideos están teñidas con queratina 5 o K5 (azul). Las barras de escala están incluidas en las imágenes.

Como se muestra en la Figura 3, paneles B-D, cuando analizamos las inmunofluorescencias, se observa que las células CSF1R-EGFP⁺ del plexo coroideo son más brillantes que las del BP, de forma ameboide y en íntimo contacto con las células endoteliales de los vasos sanguíneos del plexo, marcadas con CD31.

El endotelio vascular está separado del epitelio de los plexos por una matriz de estroma que contiene numerosos macrófagos y células dendríticas. Las células pueden transmigrar a través de las fenestraciones del endotelio vascular. Para llegar al fluido cerebroespinal (CSF) de los ventrículos cerebrales, las células que migran como macrófagos residente y las células dendríticas, deben atravesar el estroma y el epitelio, los cuales contienen uniones estrechas que forman la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BHE) (Meeker *et al.*, 2012). Usando el marcador de citoqueratina 5, que reconoce las células epiteliales de los plexos coroideos (Alam *et al.*, 2011), nos permite distinguir si la localización de estas células es dentro de cavidad estromática o si por el contrario se encuentran en el espacio ventricular. Si bien algunas células se localizan por fuera, la mayoría se localizaron dentro del espacio estromático, cerca de los vasos (Figura 3, panel B-E).

En el parénquima del cerebro, aparte de la microglía, se observa la existencia de células CSF1R-EGFP⁺ que se sitúan alrededor de los espacios vasculares, en particular en los vasos que irrigan el BP (Figura 4). Se sabe que el cerebro es un órgano altamente vascularizado (Cipolla, 2009; Decimo *et al.*, 2012) y se conoce la existencia de macrófagos perivasculares situados entre las láminas basales del vaso. Para poder visualizar si estas células EGFP⁺ son realmente macrófagos perivasculares, analizamos en primer lugar las tinciones del parénquima cerebral con anticuerpos anti-CD31. Se observa células CSF1R-EGFP⁺ rodeando y en íntimo contacto con las formaciones vasculares (CD31⁺). Para discernir si estas células estaban situadas en el propio parénquima celular o eran macrófagos perivasculares propiamente dichos, se realizó una doble inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen la laminina. La laminina es una glicoproteína que constituye uno de los principales componentes de las membranas basales, se encuentra rodeando el endotelio y encierra pericitos y células del músculo liso en la pared del vaso (Sixt *et al.*, 2001; Yousif *et al.*, 2013). Se utilizó un anticuerpo pan-laminina, que reconoce varias isoformas, en concreto las cadenas de la laminina $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$. (Sixt *et al.*, 2001).

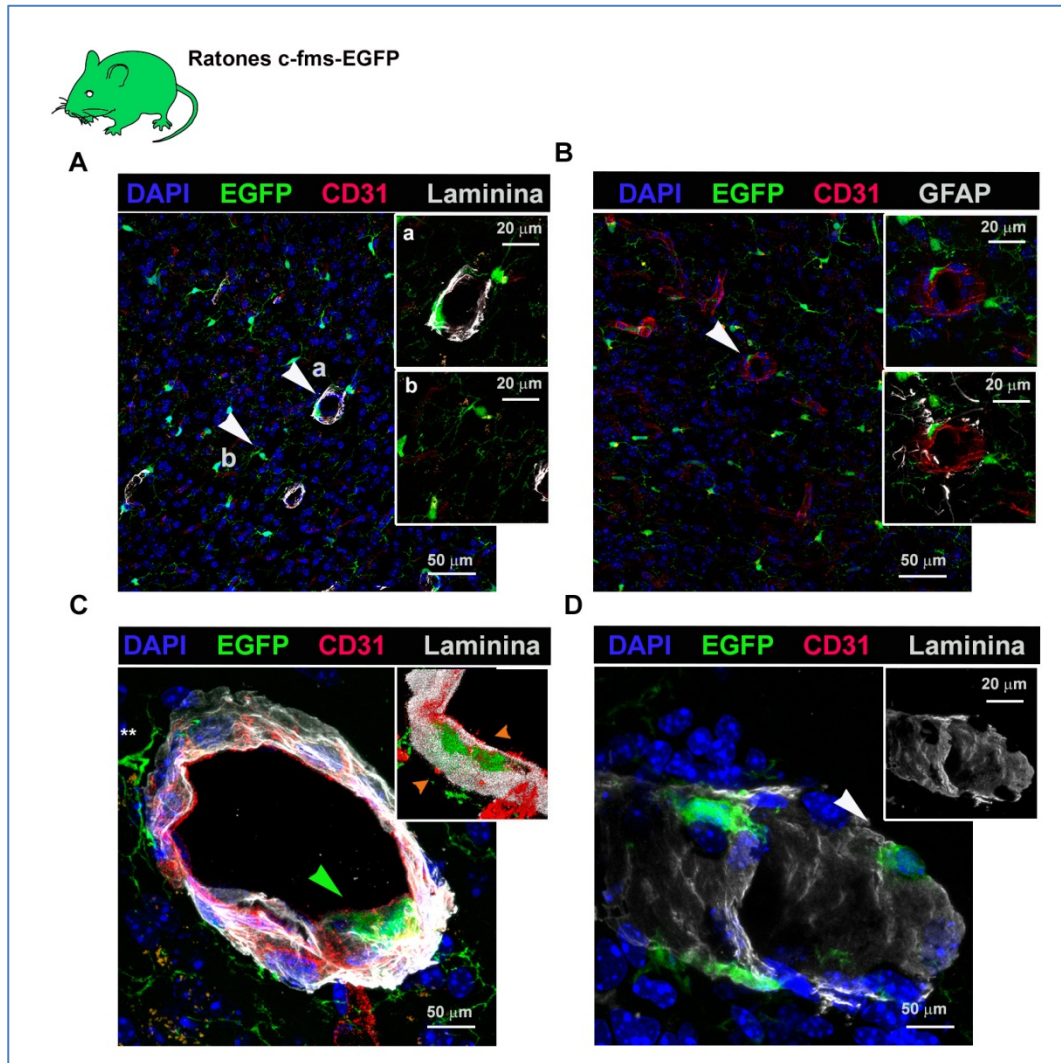


Figura 4. Resultados.- Expresión de EGFP en vasos sanguíneos de ratones transgénicos B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP) 1Hume/J. (A y B) Imágenes de confocal a 40x de células EGFP positivas del parénquima cerebral y capturas a 63x (digital zoom 3x) de las células marcadas con una flecha. Las células aumentadas en detalle muestran los núcleos teñidos de DAPI (azul) y vasos sanguíneos con CD31 (rojo). (A) Muestra el marcaje de pan-laminina que reconoce la membrana basal de los vasos (en blanco), donde se aprecia la diferencia (indicado con flechas), entre células de parénquima y las células en posición perivascular. (B) Se muestra el marcaje con GFAP de astrocitos (mostrado en blanco), donde las flechas señalan un macrófago perivascular entre las células GFAP⁺ y CD31⁺. (C) Imágenes de microscopía confocal mostrando un vaso sanguíneo al detalle (objetivo 63x, zoom digital 3x). Con doble asterisco (**) se marca una célula positiva para Csf1r-EGFP cerca del vaso sanguíneo (en posición yuxtavascular) y con una flecha verde se marca un macrófago perivascular. El recuadro muestra una reconstrucción 3D de células positivas para Csf1-EGFP perivascular. Las flechas naranjas dentro del recuadro indican ambas membranas basales (endotelial y de parénquima) alrededor de las células positivas para Csf1-EGFP. (D) Las células Csf1r-EGFP⁺ están, de hecho, en contacto íntimo con las membranas basales; cuando eliminamos la señal EGFP de la imagen de confocal (en recuadro), aparecen como “huecos” dejados por la tinción de laminina. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 a partir de secciones de criostato (30 μ m de grosor). Las barras de escala están incluidas en las imágenes. Las imágenes son representativas de un experimento de n=4 ♂ en diferentes localizaciones del cerebro.

1.2. Expresión de Iba-1 en el cerebro

Como se ha descrito en la Introducción, uno de los marcadores de microglía más utilizados en el campo para la visualización de microglía es Iba-1 (ionized calcium binding adapter molecule 1). Iba-1 es una proteína de unión a calcio específica de microglía/macrófagos (Ito *et al.*, 1998). En este apartado, se analiza la expresión de Iba-1 en las distintas localizaciones dónde se había visualizado células CSF1R-EGFP⁺ en el cerebro. Se realizaron tinciones de los cortes de cerebros de ratones Csfr1-EGFP⁺ con este marcador y se analizaron mediante microscopía confocal, tal como se especifica en el apartado Materiales y Métodos. Para contajes se recurrió a mapas de regiones concretas y capturas de imágenes a 40x.

Como se muestra en la Figura 5, existe co-expresión de Iba-1 en el $99 \pm 0.7\%$ de células CSF1R-EGFP⁺ en el BP en las secciones de criostato analizadas (Figura 5, panel A). Las células Iba-1^{low/-} CSF1R-EGFP⁺ en el parénquima cerebral son escasas ($0,3 \pm 0,4\%$) y las pocas que se encontraron estaban cerca de vasos sanguíneos, posiblemente macrófagos perivasculares. En inmunofluorescencia de plexos coroideos en secciones de criostato, aparte de la abundante población CSF1R-EGFP⁺-Iba-1⁺, existe una población de células Iba-1^{low/-} CSF1R-EGFP⁺, contabilizando $7 \pm 2\%$ del total de células CSF1R-EGFP⁺ en los plexos coroideos (Plexo Ch, en la Figura 5, panel B). En ningún caso se pudo observar células Iba-1⁺ que fueran CSF1R-EGFP⁻.

RESULTADOS

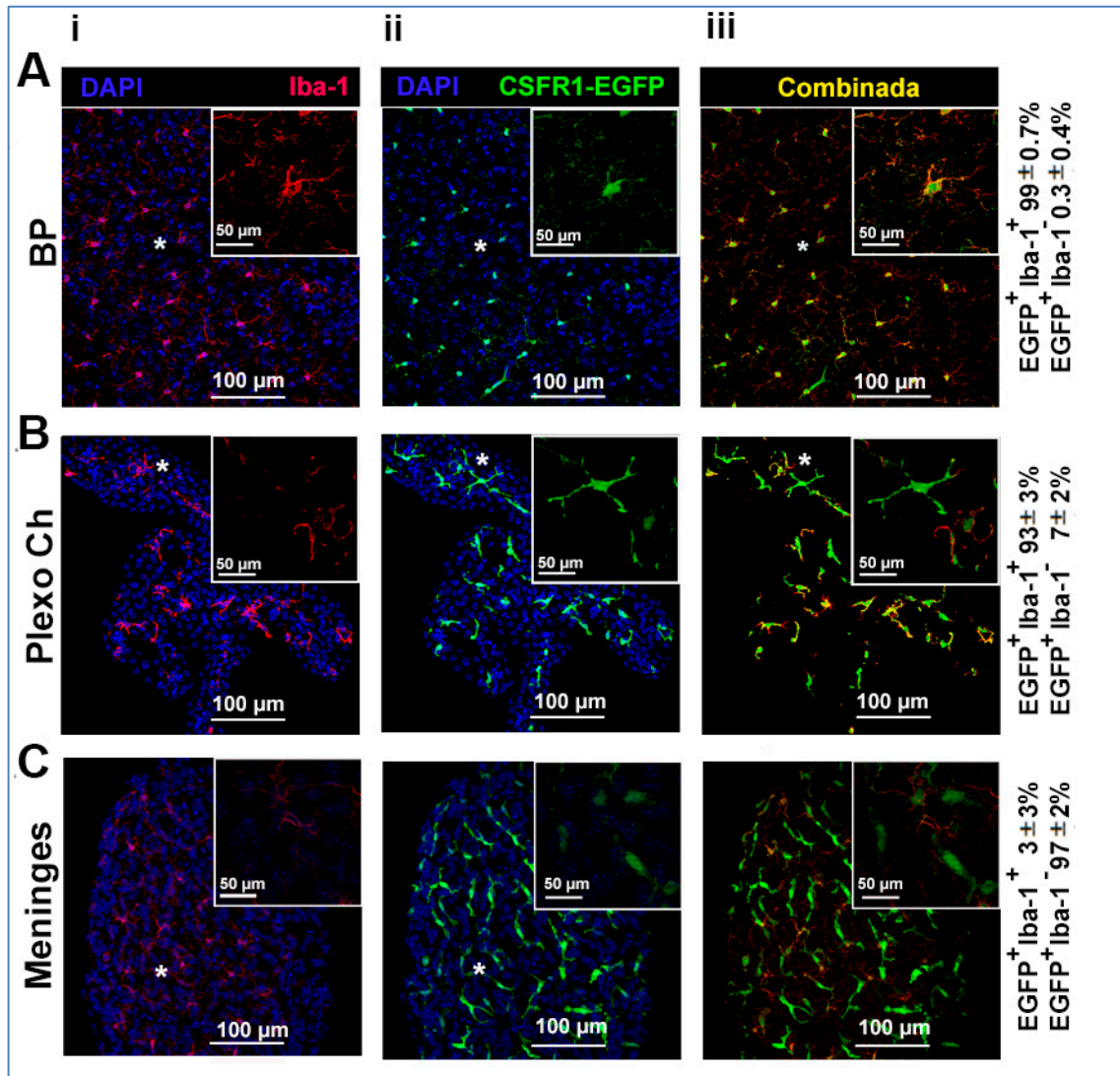


Figura 5. Resultados.- Expresión de EGFP e Iba-1 en el ratón adulto sano transgénico *Csf1r*-EGFP. Co-localización de inmunofluorescencias representativas de Iba-1 (Wako) y fluorescencia directa de EGFP en secciones coronales en el cerebro *CSF1R*-EGFP de: (A) parénquima cerebral, (B) plexos coroideos, (C) secciones horizontales de 80 µm de BP con membranas meníngeas (membrana pial). La columna i) muestra la tinción de Iba-1 en rojo (Cy3) y la tinción nuclear en azul (DAPI). La Columna ii) muestra la fluorescencia directa de EGFP en verde y la tinción nuclear en azul (DAPI). La columna iii) muestra imágenes de fluorescencias combinadas de Iba-1 en rojo (Cy3) y EGFP en verde. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido SP5 TCS, con objetivos de 40x (paneles principales) y a 63x con un zoom digital 3x (recuadros de detalle), que muestra las células marcadas con un asterisco en los paneles principales. Las barras de escala están incluidas en las imágenes. Las imágenes son representativas de al menos 3 diferentes preparaciones. El porcentaje de células Iba-1⁺ *CSF1R*-EGFP⁺ en cada área del cerebro está indicada como media ± SEM de n=3 animales ♂. En las preparaciones de meninges, las *CSF1R*-EGFP⁺ evaluadas fueron aquellas situadas en los primeros 30 µm de secciones horizontales de vibratomo de 80 µm.

Cuando se analizaron las preparaciones de meninges, a partir de los cortes de 80 µm de vibratomo, se observaron células *CSF1R*-EGFP⁺ que eran claramente Iba-1^{low/-}, contabilizando 97 ± 2% del total de células *CSF1R*-EGFP⁺ (Figura 5, panel C); de hecho, la mayoría de las células muy brillantes *CSF1R*-EGFP⁺ localizadas en la membrana pial fueron Iba-1^{low/-}, y sólo se pudo ver células Iba-1⁺ *CSF1R*-EGFP⁺ en el propio tejido cerebral.

Por lo tanto, podemos concluir que en BP y en los plexos Ch, la expresión de CD115/CSF1R e Iba-1 co-localizan pero no en las células CSF1R-EGFP⁺ de las meninges. Por lo tanto, Iba-1 no es un buen marcador para visualizar los macrófagos de las meninges.

2. Aislamiento y caracterización de células mieloides del cerebro de ratón adulto

2.1. Aislamiento de células de cerebro CSFR1-EGFP positivas

El interés en el aislamiento de las células mieloides del cerebro adulto es creciente, dada la importancia del estudio de los procesos de infiltración en el SNC de leucocitos como resultado de la permeabilidad de la BHE, la diferenciación de progenitores o la proliferación de microglía propiamente dicha en la fisiología y patología cerebral (Björkqvist *et al.*, 2008). Por lo tanto, el siguiente objetivo ha sido el aislamiento de las células mieloides del cerebro de ratón adulto, basándonos en los protocolos de gradientes discontinuos de percoll, tal como ha sido descrito en el apartado de Materiales y Métodos.

Para llevar a cabo este objetivo, los ratones wt y Csfr1-EGFP de edades especificadas en las leyendas de las figuras, fueron anestesiados y perfundidos durante 5 minutos con un volumen total de 25 ml de PBS (ver Materiales y Métodos). Este procedimiento nos asegura la eliminación de células procedentes de la circulación sanguínea periférica en los siguientes pasos de purificación. Una vez eliminados los restos de sangre, los cerebros presentaban un color blanquecino y pasamos a la disección de distintas partes del cerebro. Por un lado, aislamos las membranas de las meninges y los plexos coroideos (m/Ch); debido al escaso número de células que se obtienen de estas localizaciones, el análisis de las células m/Ch por citometría y q-PCR se han realizado en un grupo común. Ambas regiones están anatómicamente relacionadas en el desarrollo (tela coroidea con la cisterna magna y contiguo a la piamadre sobre el tronco cerebral) (Robinson y Goldstein, 2007). Además, ambas localizaciones están en contacto con el exterior del SNC y por lo tanto son la primera barrera que detecta la inflamación que transcurre a nivel sistémico y su efecto en el cerebro (Schwartz y Deczkowska, 2016; Skarica *et al.*, 2009). Por otro lado, se homogenizó y se digirieron el resto del cerebro, con excepción de los bulbos olfatorios y el cerebelo como ya ha sido descrito anteriormente. Las preparaciones celulares así obtenidas (BP) se utilizaron para los siguientes análisis y las células aislada. Mediante tinción de Giemsa, muestran en su mayoría morfología de macrófago, similar a a lo publicado (Gómez-Perdiguero *et al.*, 2015) (Figura 6, panel A).

RESULTADOS

Una vez aisladas las células de estas dos localizaciones en ambos tipos de ratones: membranas m/Ch y BP, se hizo una exclusión de dobletes mediante los análisis indicados en la Figura 6.

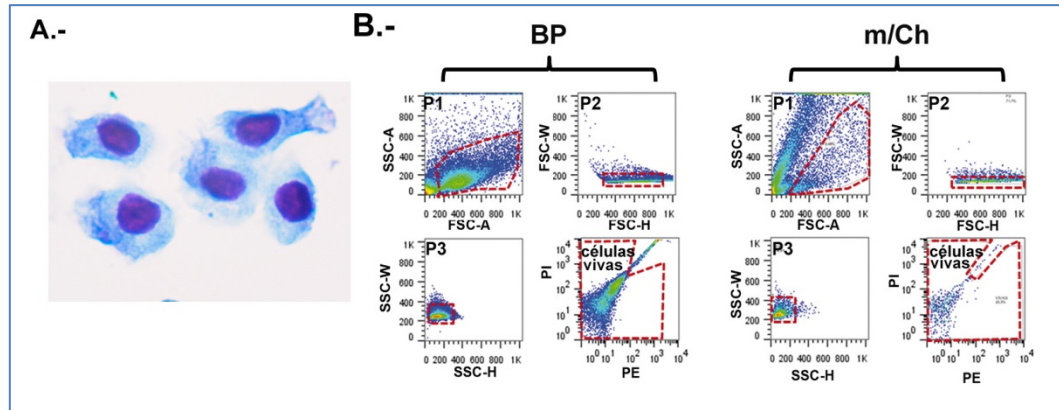


Figura 6. Resultados.- Estrategia de selección de poblaciones (gating) para análisis por citometría de flujo: (A) Imagen representativa de las células aisladas por gradiente de Percoll en muestras de BP, teñidas con Giemsa. (B) Las células fueron obtenidas y marcadas tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos de muestras de cerebro sin m/Ch (BP) y de m/Ch. Antes de comenzar el análisis por citometría de flujo, se añade yoduro de propidio (PI; 0,5 μ g/ml) para determinar la viabilidad celular. Las células fueron primero seleccionadas (P1) en base al tamaño y complejidad (SSC vs FSC). Se descartaron dobletes mediante análisis de FSC-H vs FSC-W y SSC-H vs SSC-W y se seleccionaron las células IP negativas (i.e. células vivas) para continuar los análisis.

En ellos, se analizó la dispersión frontal de la luz (forward scatter, FSC), valor proporcional al tamaño celular, y la dispersión de la luz ortogonal (SSC), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula. Una vez eliminados digitalmente los residuos celulares y los dobletes, se analiza la expresión de la proteína fluorescente EGFP mediante citometría de flujo de las células obtenidas de los ratones salvajes (wt) y los ratones *Csf1r-EGFP*, junto con la expresión del marcador celular CD45. Como se ha mencionado en la Introducción, la mayoría de las células del cerebro: astrocitos, neuronas y oligodendrocitos son de origen ectodérmico (Pino y Cardona, 2011) y no son positivas para el marcador celular CD45. La microglía se considera la única célula propiamente del cerebro que presenta una expresión media de este marcador hematopoyético (Ford *et al.*, 1995).

RESULTADOS

En la Figura 7 se muestra la expresión y porcentaje de las células CD45⁺ EGFP⁺ aisladas de estas dos cepas de ratón. En el panel A, se muestran los análisis por citometría de las células procedentes del BP, las células CD45⁺ constituyen el 30-40% de células totales vivas aisladas en el cerebro sin m/Ch (Figura 7A, paneles i-iv). El porcentaje de células CD45⁺ obtenidas fue similar en *wild type* (wt) y ratones Csf1r-EGFP. En células aisladas de ratones Csf1r-EGFP, más del 96% de las células fueron CSF1R-EGFP⁺ CD45⁺. Las células CD45⁺ EGFP⁻ aisladas de los ratones Csf1r-EGFP fueron escasas en ambos tipos de preparaciones.

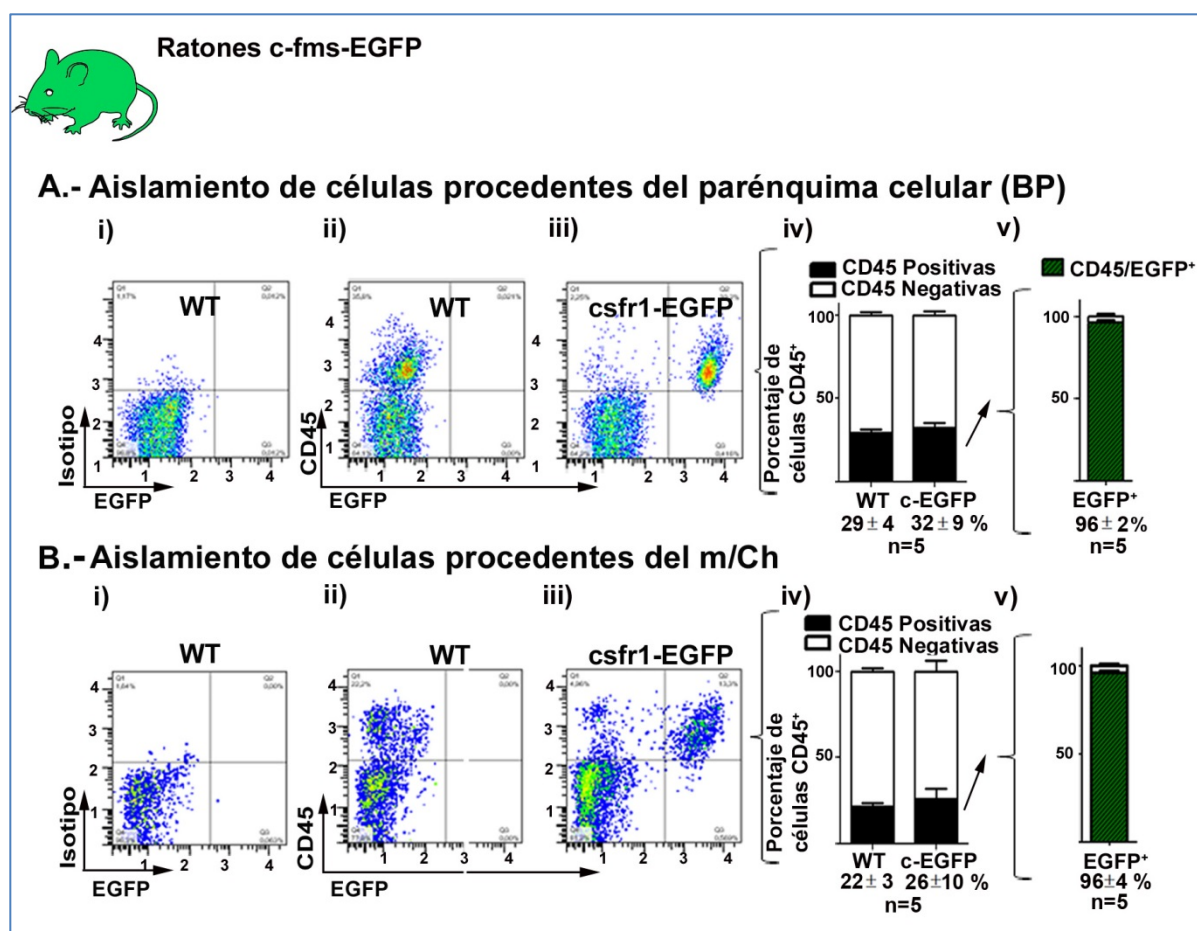


Figura 7. Resultados.- Identificación de células CSF1R-EGFP y CD45 positivas en el cerebro. Diagramas de punto de citometría de flujo de células vivas aisladas de (A) cerebro excepto bulbos olfatorios, cerebelo, membranas meníngeas y plexos coroideos (B) membranas meníngeas y plexos coroideos (m/Ch). Las células fueron aisladas de ratones *wild type* (wt) y Csf1r-EGFP, y teñidas con control de isotipo (APC rat IgG2b; panel i) o con APC rat anti-mouse CD45 (paneles ii y iii). El panel iv muestra la media aritmética ± SEM (n= 5) del porcentaje de células aisladas de CD45⁺ (en negro) y CD45⁻ (en blanco). El panel v representa la media aritmética ± SEM (n= 5) del porcentaje de células EGFP⁺ de las células Csf1r-EGFP aisladas. La estrategia de selección fue descrita en la Figura 6.

En Figura 7, panel B, se muestran los análisis de las células obtenidas de las preparaciones m/Ch. En los ratones Csf1r-EGFP y wt no se detectaron diferencias en el porcentaje de células CD45⁺ obtenidas de los m/Ch de ambas cepas. Sin embargo, el

porcentaje de células CD45⁺ totales fue algo menor (entre el 20-30%) con respecto al porcentaje obtenido en BP (25-40%) (Figura. 7A y B, paneles i-iv). De las células CD45⁺ aisladas del ratón Csfr1-EGFP, más del 96% de las células fueron CSF1R-EGFP⁺ CD45⁺, del mismo modo que para parénquima. Para incluir esta pequeña subpoblación de CSF1R-EGFP⁺ CD45⁺ en este estudio, se usó de marcaje CD45 en vez de expresión de EGFP para estudiar las células mieloides del cerebro en los análisis consecutivos.

2.2. Caracterización de células CD45 positivas en el parénquima cerebral

Una vez que habíamos conseguido aislar eficientemente las células mieloides del cerebro del ratón adulto, el objetivo ha sido la caracterización de los distintos tipos celulares en el cerebro sano. Como ya se ha mencionado anteriormente en la Introducción, la existencia de células dendríticas en el cerebro ha sido anteriormente propuesta en ratones, ratas y humanos (Hanly y Petito, 1998; Matyszak y Perry, 1996; McMenamin, 1999; Pashenkov *et al.*, 2001; Serot *et al.*, 1997), estas células tienen marcadores específicos de células dendríticas como son el marcador CD11c, también conocido como ITAGX (Integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)). Por lo tanto, para poder estudiar la existencia de este tipo celular, utilizamos una aproximación experimental que ya ha sido utilizado en otros contextos celulares; (Anandasabapathy *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2003) y se especifica en detalle en el apartado Materiales y Métodos. Para ello, los ratones fueron inyectados con una línea celular tumoral como son las B16-Flt3L que son capaces de producir grandes cantidades de Flt3L. Como se indica en la Introducción, el receptor de tirosina quinasa similar a Fms-3 (Flt3: Fms-like tyrosine kinase 3) y su citoquina ligando (Flt3L) juega un papel central en la hematopoyesis y el sistema inmune, estableciendo cascadas de señalación cruciales para el desarrollo y la homeostasis de los progenitores hematopoyéticos y las células dendríticas presentadoras de antígenos (Verstraete *et al.*, 2011). El ligando Flt3L contribuye a la diferenciación de progenitores pero no de monocitos, dando lugar a la expansión tanto de células dendríticas clásicas (cDCs) como plasmacitoides (pDCs) en todos los órganos linfoides y no linfoides (Anandasabapathy *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2011; Kingston *et al.*, 2009; Verstraete *et al.*, 2011), (ver Figura 3 Introducción).

En la Figura 8, se muestran los análisis mediante citometría de flujo de las preparaciones celulares del BP procedentes de ratones wt sin tratar (-Flt3L) o tratadas con B16-Flt3L (+Flt3L). Las células aisladas del BP se analizaron en función de la cantidad del marcador CD45⁺ expresado y en función de la intensidad de fluorescencia. En concordancia con los datos publicados (Carson *et al.*, 1998), se designaron como CD45^m (intensidad media)

RESULTADOS

y CD45^h (intensidad alta). Como se muestra en la Figura 8, panel A, el tratamiento con Flt3L no incrementó el número total de células CD45⁺ aisladas (apartado I). Sin embargo, sí incrementó el porcentaje de células en CD45^h en la población CD45⁺ aisladas (apartado II). Para dilucidar si estas células CD45^h eran de naturaleza mieloide, se empleó un marcador como el CD11b. CD11b es también conocido como cadena alfa M de integrina (ITGAM), se expresa en la superficie de muchos leucocitos incluyendo monocitos, neutrófilos, células NK (Natural killer), granulocitos y macrófagos (Cazareth *et al.*, 2014; Greter *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2010; Solovjov *et al.*, 2005). Estos resultados nos permitieron detectar 3 subpoblaciones diferenciadas en base a estos marcadores en las preparaciones de BP. La más abundante (69 ± 7% de células CD45⁺) fue CD45^mCD11b⁺; estas células se corresponden con la microglía de cerebro, basado en el marcaje de intensidad media de CD45 y expresión CD11b.

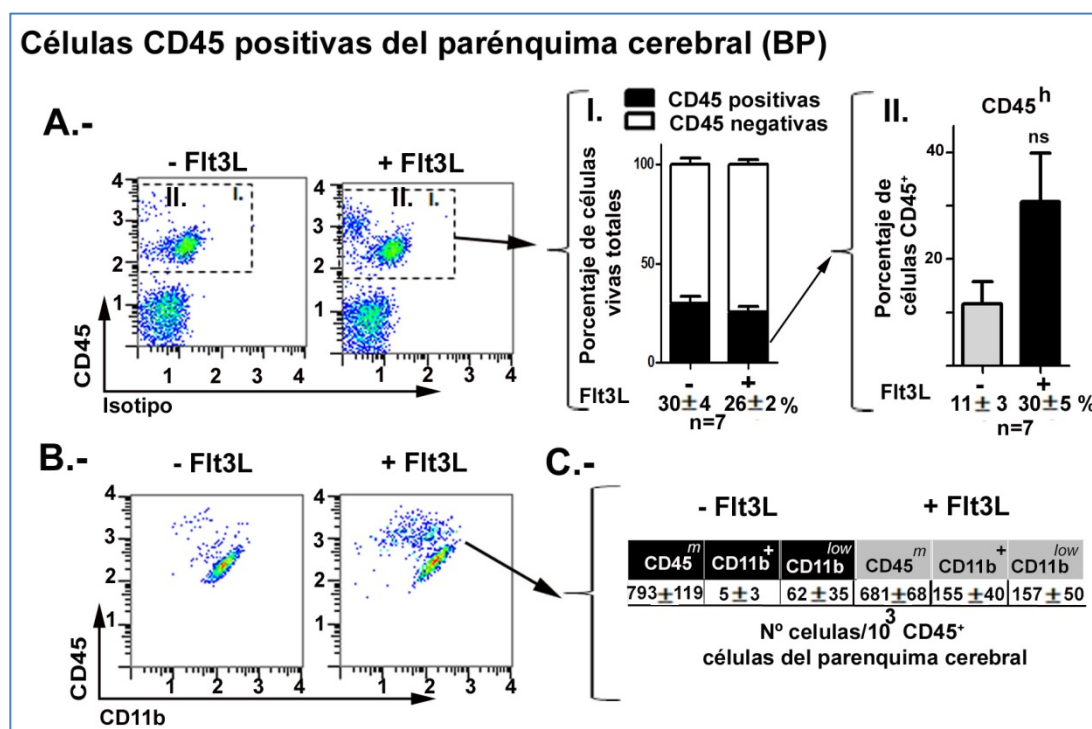


Figura 8. Resultados.- Análisis de células CD45⁺ del cerebro sin m/Ch (parénquima cerebral) en ratones wt C57BL/6 tratados con Flt3L. (A) Los ratones no tratados (-Flt3L) o inyectados con células tumorales productoras de B16-Flt3 (+Flt3L) y las células mieloides aisladas del cerebro con y sin m/Ch (14 días post inyección), fueron teñidas con APC rat anti-mouse CD45. Las barras de gráficos muestran la cuantificación de células CD45⁺ (en negro) como un porcentaje del total de las células vivas en ratones -Flt3L y +Flt3L. Las barras de los gráficos muestran el porcentaje de las células con alta expresión de CD45 (CD45^h) en ratones -Flt3L, comparado con ratones +Flt3L. (B) Las células fueron doblemente teñidas con APC rat anti-mouse CD45 junto con Cy7-APC rat anti-mouse CD11b. (C) Número de células aisladas CD45^m, CD11b⁺ y CD11b^{low} (nº de células/1000 células de parénquima CD45⁺). La estrategia de aislamiento como en Figura 6. Se muestran gráficas de punto representativas y los datos muestran la media ± SEM de un total de 7-8 experimentos independientes

En la Figura 8, panel B, se muestra así mismo la existencia de otras dos poblaciones de CD45^h que se subdividen de acuerdo a la expresión de CD11b: CD45^hCD11b⁺ (15 ± 4%) y

CD45^hCD11b^{low} (15 ± 5%). Presumiblemente, estas células corresponden a células de origen periférico tal como se describió usando irradiación de quimeras (Ford *et al.*, 1995).

2.3. Caracterización de células CD45 positivas en las membranas meníngeas y plexos coroideos

Se llevaron a cabo análisis similares a los anteriores en preparaciones celulares de m/Ch (Figura 9). En ausencia de Flt3L, el porcentaje de células CD45⁺ fue de 32 ± 6%, y aumentó al 44 ± 6% tras el tratamiento con Flt3L en estas localizaciones del cerebro, aunque no hay diferencias significativas entre los grupos (Figura 9, panel A).

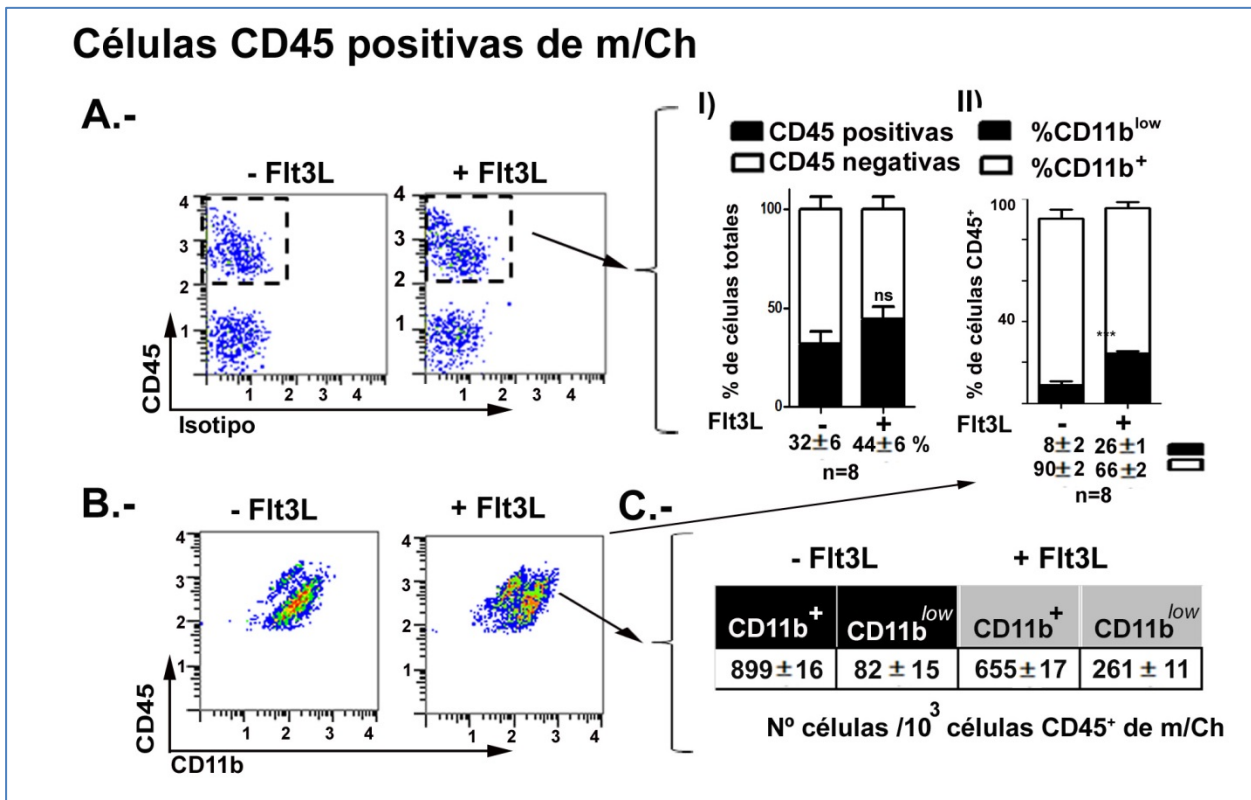


Figura 9. Resultados.- Análisis de las células CD45⁺ de las membranas meníngeas y plexo coroideo de ratones C57BL/6 tratados con Flt3L. (A) Células mieloides, aisladas de m/Ch de ratones no tratados (-Flt3L) o inyectados con células tumorales secretoras de Flt3 (+Flt3L), fueron teñidas con APC rat anti-mouse CD45. Las células CD45⁺ se seleccionaron como en Figura 8. El panel I muestra la cuantificación de células CD45⁺ (en negro) como un porcentaje de las células totales vivas en ratones +Flt3L y -Flt3L. (B) Las células fueron teñidas con APC rat anti-mouse CD45 junto con Cy7-APC rat anti-mouse CD11b. (C) Número de células aisladas CD45^m, CD11b⁺ y CD11b^{low} (nº de células /1000 células CD45⁺ de m/Ch). El apartado II del panel A muestra las células CD45^hCD11b^{low} (en negro) y CD45^hCD11b⁺ (en blanco) como un porcentaje de todas las células CD45⁺ de ratones -Flt3L y +Flt3L. Se muestran gráficas de punto representativas y los datos muestran la media ± SEM de 8 experimentos independientes.

El análisis de expresión de los marcadores CD45 y CD11b nos permitió distinguir sólo dos poblaciones: CD45^hCD11b⁺ ($66 \pm 2\%$) y CD45^hCD11b^{low} ($26 \pm 1\%$) (Figura 9, panel B). En estas preparaciones, el porcentaje y número de células CD45⁺ totales obtenidas de m/Ch no está afectado de forma significativa por el tratamiento con Flt3L aunque sí aumentó significativamente la proporción de células CD45^hCD11b^{low} ($26 \pm 1\%$) frente a un ($8 \pm 2\%$) en los animales sin tratar (Figura 9, panel A y B).

2.4. Análisis de células CD11c positivas en cerebro de ratón en homeostasis

Hasta ahora, hemos mostrado que el tratamiento de los ratones sanos con Flt3L provoca un aumento de células CD45⁺ en el cerebro, que presentan una mayor fluorescencia para este marcador. Nuestros datos están de acuerdo con los publicados por otros autores en los que se observa un incremento del compartimento de células dendríticas cerebrales (bDCs) que se expanden tras el tratamiento con Flt3L.

Estas células son CD45^hCD11c⁺MHC II⁺ (Anandasabapathy *et al.*, 2011; Greter *et al.*, 2005). Por lo tanto, quisimos comprobar si eran estas células las que nosotros expandíamos en nuestro paradigma experimental. Como mostramos en la Figura 10, panel A, nuestras células no se tiñeron con el marcador CD11c. Estos datos son inesperados, ya que como se ha descrito en la Introducción, se han visualizado células CD11c⁺ en el cerebro de ratón sano CD11c-YFP (Bulloch *et al.*, 2008) o CD11c-GFP (Prodinger *et al.*, 2011). Además, en un estudio previo se constató el enriquecimiento en células CD11c⁺ consecuencia del tratamiento con Flt3L (Anandasabapathy *et al.*, 2011). Una explicación podría ser que los tratamiento con las diferentes fosfatasas, durante el proceso de aislamiento celular (ver apartado Materiales y Métodos), degraden el marcador e impidan su visualización.

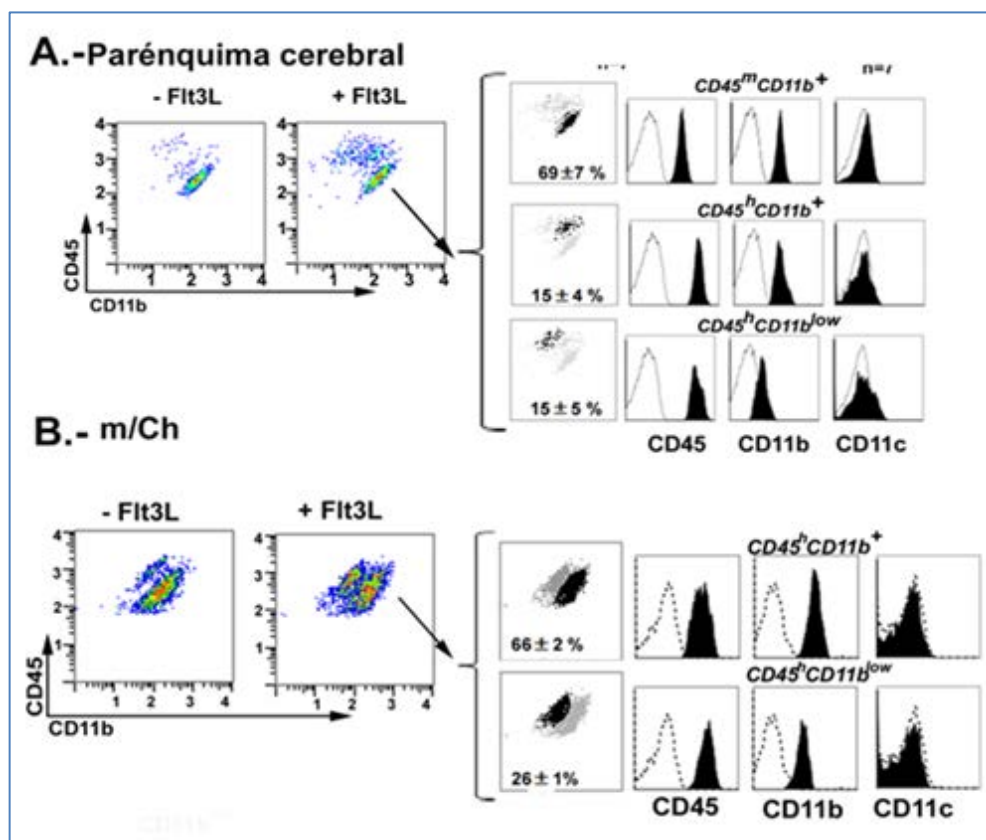


Figura 10. Resultados.- Análisis de subpoblaciones de células CD45⁺ de BP y mCh. (A) Las células parenquimales del cerebro CD45⁺CD11b⁺ de ratones tratados con Flt3L pueden ser separados en 3 subpoblaciones: CD45^mCD11b⁺; CD45^hCD11b⁺ y CD45^hCD11b^{low}. Los histogramas de la derecha muestran las tinciones de CD45, CD11b y CD11c de las células mieloides del cerebro, con o sin mCh (parénquima): los histogramas en blanco representan el control con los isotipos y los histogramas en negro representan las tinciones específicas con los anticuerpos indicados. (B) Las células de mCh CD45⁺CD11b⁺ de ratones tratados con Flt3L pueden ser separados en 2 subpoblaciones: CD45^hCD11b⁺ y CD45^hCD11b^{low}. Los histogramas de la derecha muestran la tinción de las células mieloides de mCh de CD45, CD11b y CD11c: los histogramas en blanco representan el control de los isotipo y los histogramas de negro representan tinciones específicas con los anticuerpos indicados. Se muestran gráficas de punto representativas y los datos muestran la media \pm SEM de 7-8 experimentos independientes.

2.5. Análisis de la expresión del MHC II en el cerebro sano de ratón

Como se describe en la Introducción, el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), es un tipo de molécula que normalmente se encuentra sólo en células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas, fagocitos mononucleares, algunas células endoteliales, células epiteliales del timo, y linfocitos B (Den Haan *et al.*, 2014; Ghosh, 2010; Hume, 2008; Klein *et al.*, 2009; Rose, 1998; Rothermel *et al.*, 2004). Por lo tanto, una manera de visualizar posibles células presentadoras de antígeno en el cerebro es analizando los niveles de expresión de esta molécula en el cerebro sano. En primer lugar, realizamos ensayos de inmunofluorescencia de los ratones tratados con Flt3L.

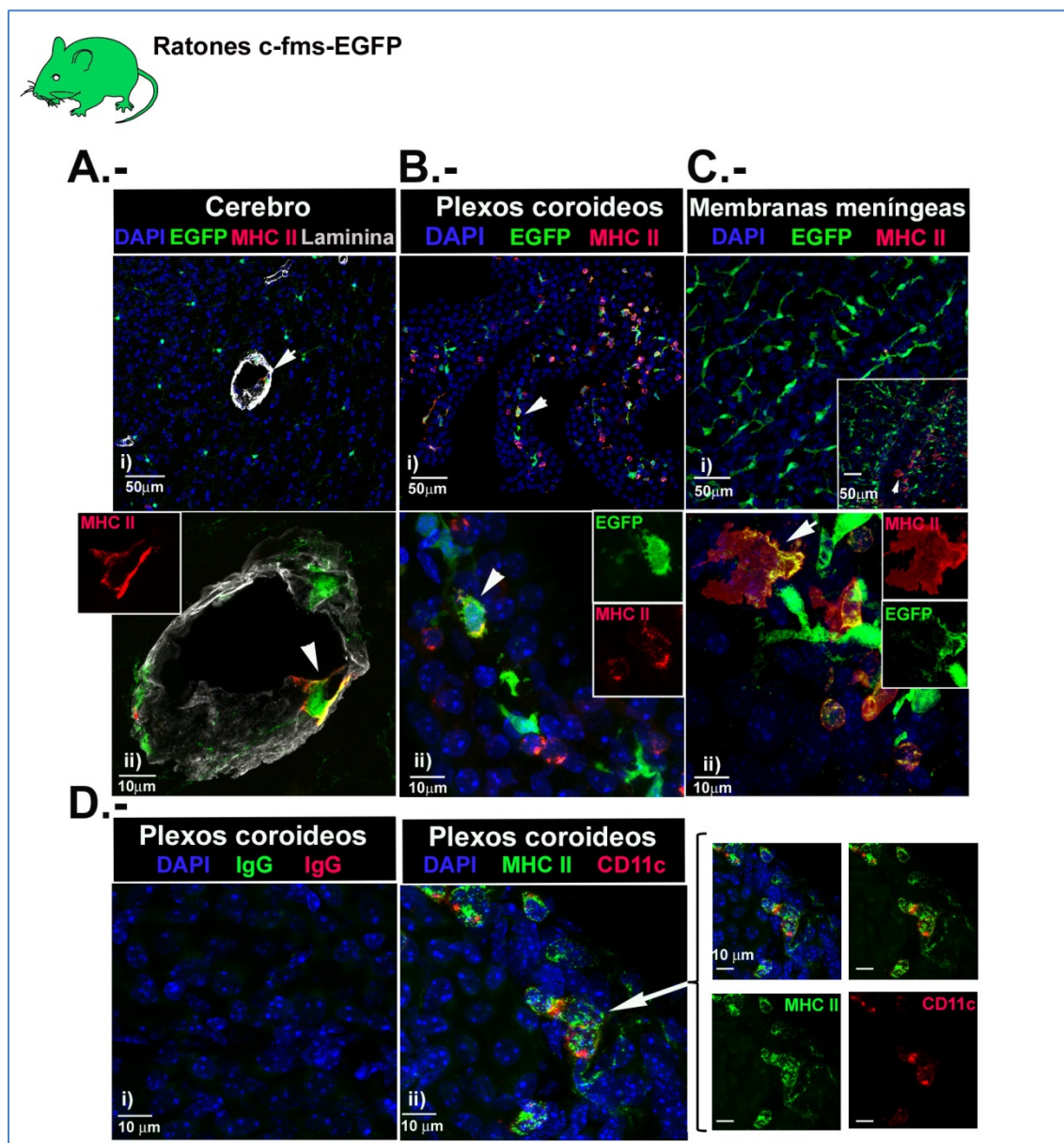


Figura 11. Resultados.- Expresión de MHC II en cerebro tratado con Flt3L por inmunofluorescencia. Se usaron secciones coronales de cerebros de 30 μm obtenidas en criostato (A y B) y secciones horizontales de 80 μm obtenidas en vibratomo para membranas de meninges (C). Las secciones fueron teñidas del siguiente modo: núcleos con DAPI (azul); microglía/macrófagos, visualizado por fluorescencia directa de CSF1R-EGFP (verde), anticuerpos para MHC II de ratón (rojo). Capturas de imagen a 40x de vasos sanguíneos (A, panel i), plexo coroideo (B, panel i) y piamadre (leptomeninge) (C, panel i); el recuadro en el panel C muestra la acumulación de células MHC II⁺ (en rojo) en áreas localizadas. Las áreas amplificadas (a 63x con zoom digital 3x), mostradas en el panel ii están marcadas (con una flecha), indicando (A, panel ii) co-localización de MHC II, CSF1R-EGFP⁺ y pan-laminina. El recuadro muestra células positivas para MHC II marcadas con una flecha (rojo). (B, panel ii), plexo coroideo, los recuadros muestran la señal de EGFP y la tinción de MHC II de forma separada. (C, panel ii), membrana meníngea, los recuadros muestran la tinción de EGFP y MHC II de forma separada de la célula señalada con una flecha blanca. En panel B y C la tinción con laminina no se muestra. (D, panel i), amplificación a 63x de plexo coroideo, muestra el control negativo de la inmunofluorescencia con tiramida. (D, panel ii), co-tinción de células CD11c⁺ (rojo), células MHC II⁺ (verde) y núcleos con DAPI (azul). Las imágenes individualizadas por canal están mostradas en los paneles de la izquierda. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido SP5 TCS, con objetivos de 40x (paneles principales) y a 63x con un zoom digital 3x.

RESULTADOS

Como se muestra en la Figura 11, sólo se ve expresión de MHC II en plexos coroideos y meninges. En parénquima no se llegó a ver marcaje de MHC II, salvo en las inmediaciones de vasos y siempre asociado a macrófagos perivascuales (Figura 11, panel A). En la membrana pial, la mayoría de estas células CSF1R-EGFP⁺ fueron MHC II⁻, y cuando estas células eran MHC II⁺ estaban localizadas cerca de vasos y formando agrupaciones de varias células (Figura 11, panel C), así como cierta regionalización de estas agrupaciones en regiones concretas del cerebro (Figura 11, panel D). Las células MHC II en la membrana meníngea fueron preferentemente detectadas en ratones +Flt3L, en concordancia a los resultados de citometría y muestran una fluorescencia EGFP disminuida (Fig. 11, panel C, apartado ii).

Para detectar células CD11c⁺, los cerebros se procesaron y tiñeron con un sistema de amplificación de la señal basado en tiramida en combinación con el anticuerpo Alexa Fluor (ver Material y Métodos). Mediante este método se observaron células CD11c⁺ principalmente en m/Ch pero no en parénquima cerebral. Las células CD11c⁺ se observaban principalmente en los plexos coroideos como se muestra en la Figura 11, panel D.

Por último, se realizaron tinciones con anticuerpos anti-Iba-1 y anti-MHC II y se analizó la co-localización de ambos marcadores (Figura 12, panel A). Se observa tinción MHC II⁺ principalmente en los plexos coroideos (Figura 12A, panel i y ii) y también en las membranas meníngeas (Figura 12A, panel iii). En parénquima cerebral, se detectaron células MHC II⁺ sólo en las inmediaciones de vasos y en algunas regiones concretas como órganos circunventriculares (Figura 12A, panel iv). Estos datos coinciden con los macrófagos perivascuales observados en ratones Csfr1-EGFP (Figura 4), y del mismo modo que para CSFR1EGFP. Las células MHC II⁺ no coinciden con las células Iba-1⁺ (Figura 12, panel v).

Estos datos se compararon con los resultados de citometría, analizando las suspensiones celulares aisladas del cerebro sin m/Ch (Figura 12, panel B) y preparaciones de m/Ch (Figura 12, panel C). Las muestras de BP de animales control no tratados (-Flt3L) presentan un fenotipo CD45^m, y los análisis de inmunofluorescencia mostraron que esas células eran MHC II⁻. El tratamiento con Flt3L (+Flt3L) indujo la expresión de MHC II en menos del <1% de las células en estas subpoblación de CD45^m. Un 36 ± 5% de la población CD45^hCD11b⁺ son células MHC II⁺, este porcentaje no varió significativamente en presencia de Flt3L (41 ± 7%). Sin embargo, si se detectó un aumento de células CD45^hCD11b^{low} en los animales tratados con Flt3L, pasando del 44±5 al 79±7%.

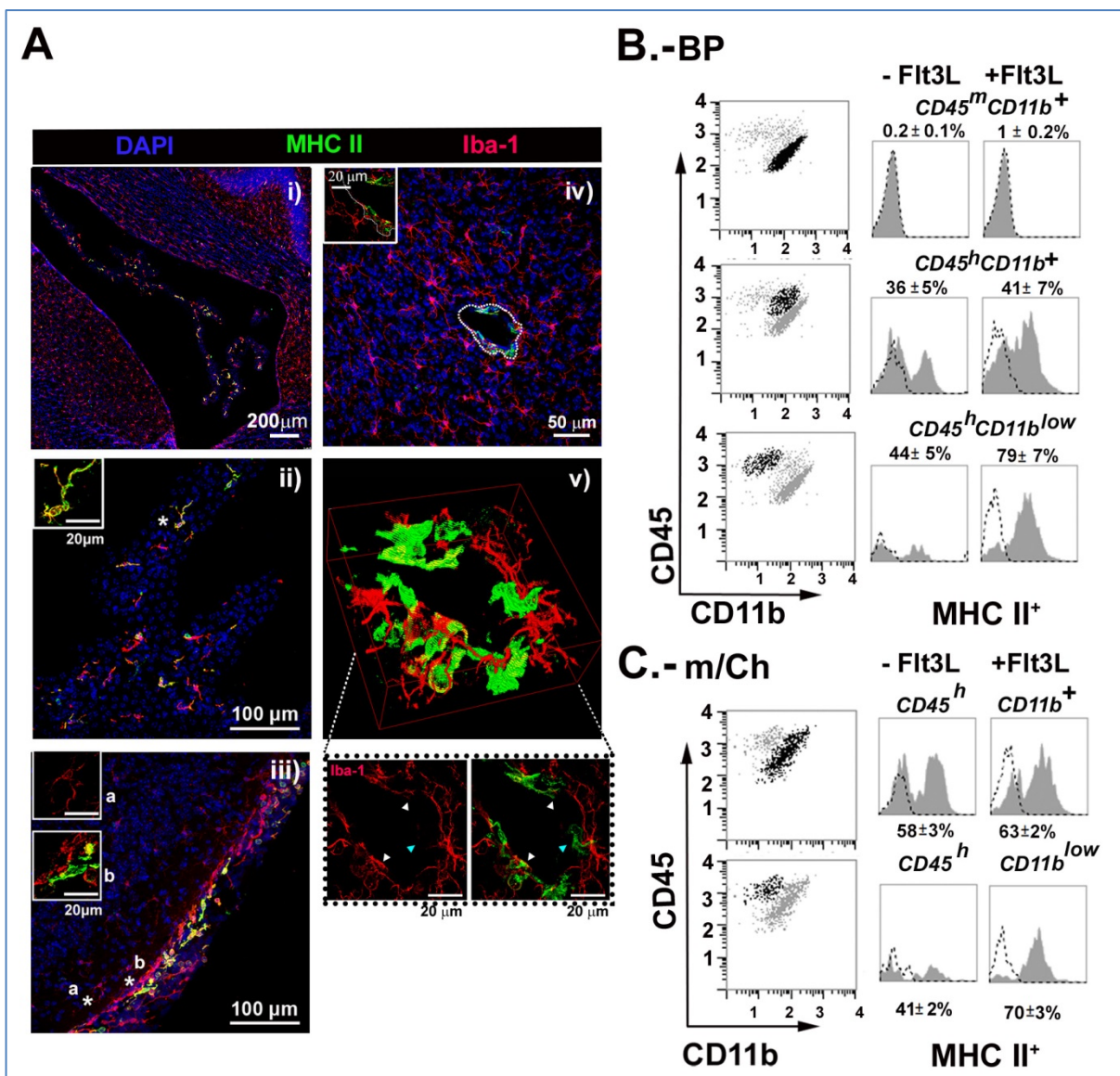


Figura 12. Resultados.- Expresión de MHC II e Iba-1 en el cerebro tratado con Flt3L. (A) Doble tinción de inmunohistoquímica en el cerebro de ratones adultos wt tratados con Flt3L (+Flt3L). Las secciones coronales de cerebro fueron teñidas con anticuerpos contra MHC II de ratón (verde), el marcador de macrófagos/microglía con Iba-1 (rojo), y los núcleos con DAPI (azul). i) Mapa a 40x (zoom digital 1,7) de parénquima y plexo coroideo. ii) imagen de confocal a 40x del plexo coroideo. Los recuadros muestran ampliificaciones a 63x de la región marcada (*), mostrando co-localización de MHC II e Iba-1. iii) Imagen a 40x de parénquima y membranas meníngeas; el recuadro a muestra la tinción células Iba-1⁺ y MHC II⁺ en parénquima cerebral; el recuadro b muestran células Iba-1⁺ y MHC II⁺ en membranas meníngeas. iv), imagen a 40x de vaso sanguíneo (delimitado en línea discontinua) en una región de parénquima cerebral. v). reconstrucción 3D de la imagen anterior a partir de una imagen tomada con un objetivo de 63x (Zoom digital 3x), mostrando la ubicación de las células MHC II⁺ alrededor del vaso y señalando (en las ampliaciones individualizadas por canales) la tinción tenue para Iba-1 de las células MHC II⁺, indicado con flechas blancas (las azules marcan las células Iba-1⁺ MHC II⁺). Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 TCS, equipado con un objetivo 40x o 63x con zoom digital 3x. (B, C) Diagramas de puntos de citometría de flujo de células positivas de CD45/CD11b en el parénquima cerebral (B) y membranas de m/Ch (C) de ratones no tratados -Flt3L y tratados +Flt3L (detalles en Figuras 8-10). Los histogramas muestran los resultados de la tinción para MHC II con el anticuerpo FITC rat anti-mouse MHC II. Las líneas discontinuas representan la fluorescencia del control de isotipo; los histogramas en gris, representa las tinciones específicas. El porcentaje de células MHC II⁺ en cada población está indicado como media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Los análisis en las preparaciones de m/Ch, sólo la población CD45^hCD11b^{low} responde al tratamiento, pasando de 41±2 a 70±3% (Figura 12, panel C). Cuando las preparaciones de m/Ch fueron analizadas, se observó un incremento de 3 veces en el número de células CD45^hCD11b^{low}, tal como se mostraron antes (Figura 9, panel C). De estas células CD45^hCD11b^{low} obtenidas de m/Ch, 70 ± 3% fueron MHC II⁺.

En conclusión, el tratamiento con Flt3L preferencialmente expande una subpoblación de CD45^hCD11b^{low} de células MHC II⁺ en m/Ch. El hecho de que estas células aumenten en presencia de Flt3L y tengan un fenotipo CD45^hCD11b^{low} MHC II⁺ sugiere que son las bDCs previamente descritas en m/Ch (Anandasabapathy *et al.*, 2011; McMenamin, 1999; McMenamin *et al.*, 2003; Prodinger *et al.*, 2011). Hemos observado que estas células se localizan principalmente en plexos coroideos.

3. Caracterización de células DNDR-1/CLEC9A positivas en cerebro de ratón adulto en homeostasis.

3.1- Expresión de transcritos Dngr-1/Clec9a en el cerebro del ratón

El perfil de expresión génica de las células mieloides m/Ch, que responden a Flt3L, guardan una fuerte similitud con la subpoblación DC CD8α⁺ descrita en bazo (Anandasabapathy *et al.*, 2011). La expresión de DNDR-1 (CLEC9A) es un excelente marcador de DCs dependientes de Batf3-IRF8-Id2 de la familia CD8α⁺ (Caminschi *et al.*, 2009; Sancho *et al.*, 2008); revisado en (Shortman y Heath, 2010). Mediante el tratamiento con Flt3L se aumenta la población de DCs DNDR-1⁺ como ha sido descrito anteriormente (Iborra *et al.*, 2012). En esta población se analizó la expresión del ARNm Dngr-1 en distintas estructuras cerebrales: Bulbo Olfatorio (Ob); Cerebelo (Cbl); Corteza cerebral (CTX); Estriado (Str); Membranas meníngeas y plexos coroideos (m/Ch); Zona subventricular (SVZ) aislada según (Ferrón *et al.*, 2007); Formación Hipocampal (Hpp) y Tálamo (Th); y usando el Bazo como control positivo (Spleen). Sólo las muestras m/Ch mostraron expresión de todas las isoformas de Dngr-1 (Figura 13), de forma similar a las isoformas definidas en el bazo de ratón (Sancho *et al.*, 2008). Como control de la especificidad, se utilizó el bazo y el tejido cerebral de ratones Clec9a^{egfp/egfp} knock out no tratados y tratados con Flt3L, que carecen de DNDR-1, confirmando que no se amplificó el transcrito Dngr-1 en estas muestras (datos no mostrados).

La expresión selectiva de Dngr-1 en membranas m/Ch de animales tratados con Flt3L fue corroborada por PCR en tiempo real. La mayor sensibilidad de esta técnica permitió la

RESULTADOS

detección de transcritos Dngr-1 en la BP, pero en cantidades más bajas que en m/Ch. El tratamiento con Flt3L aumentó fuertemente la transcripción de Dngr-1 en esplenocitos y preparaciones m/Ch, siendo la expresión de Dngr-1 en esplenocitos tratados con Flt3L alrededor de 5 veces más alta que en las preparaciones de células m/Ch (Figura 13, panel C). Este incremento desencadenado por Flt3L en la expresión de Dngr-1 es consistente con el aumento en el porcentaje de células CD45^h inducidas por la misma citoquina (Figura 10 y 12). En conjunto, estos resultados muestran que Flt3L induce la expresión de Dngr-1 preferentemente en las membranas m/Ch.

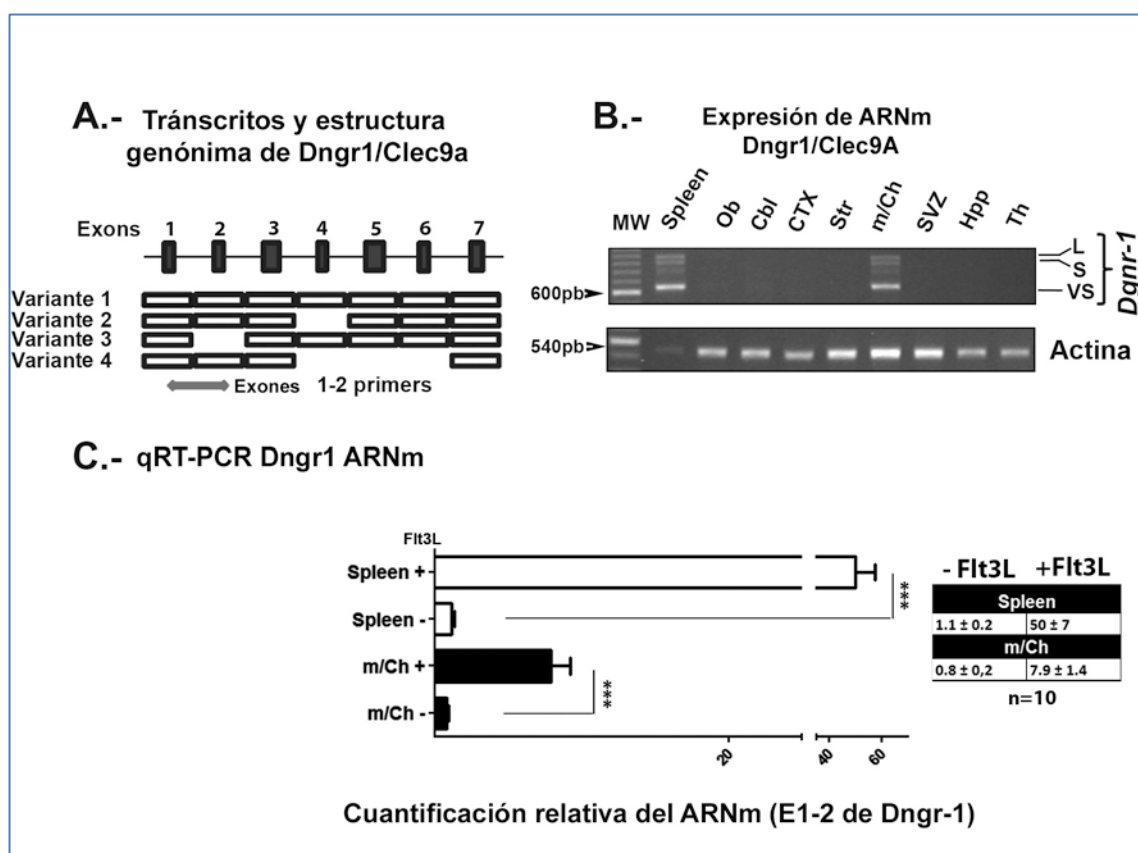


Figura 13. Resultados.-Estructura y expresión génica de Dngr-1 / Clec9a de ratón. (A) Estructura del gen Dngr-1/Clec9a, mostrando los intrones y exones constituyentes. Las posibles variantes de la proteína DNGR-1 se representan debajo. Se indica la región amplificada por los cebadores de PCR en tiempo real. (B) Expresión del ARNm de Dngr-1 en el bazo (spleen) y diferentes tejidos cerebrales (Ob: bulbo olfatorio, Cbl: cerebelo, CTX: corteza, Str: estriado, m/Ch: meninges/membranas del plexo coroideo, SVZ: zona subventricular, Hpp: Hipocampo, Th: tálamo). Las muestras se analizaron por RT-PCR con cebadores para Dngr-1 y con β -actina como gen de referencia. Las muestras se cargaron en cantidades iguales, excepto para el bazo, que se cargó a una dilución relativa de 1/30 con el fin de evitar la saturación debido a la alta expresión en este tejido. Las longitudes de los distintas isoformas de Dngr-1 específicas se indican de la siguiente manera: L corresponde a la variante 1 de Dngr-1 (996 pb), S corresponde a las variantes 2 y 3 (918 y 915 pb) y VS a la variante 4 (647 pb). (C) Expresión de ARNm de Dngr-1 de ratón en bazo, membranas m/Ch y parénquima cerebral de animales tratados (+) sin tratar (-) y Flt3L. El ARNm específico de Dngr-1 se amplificó a partir del ARNm total utilizando la metodología de PCR en tiempo real de SYBR Green; La muestra de referencia fue el bazo de animales no tratados y el gen de referencia fue 36B4. ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$ para muestras no tratadas (-) frente a muestras tratadas con Flt3L (+) (n = 10).

RESULTADOS

Los procedimientos para aislar las poblaciones celulares del cerebro adulto exponen las células a enzimas y fuerzas mecánicas que pueden dañar membranas o moléculas de membranas. Algunos de estos procedimientos enzimáticos podrían escindir marcadores celulares específicos de membrana de interés tales como DNGR-1, dando lugar a falsos resultados negativos en el análisis FC. Para eludir este problema, se utilizó ratones *Clec9a^{egfp/egfp}* (Sancho *et al.*, 2009), que expresan una forma farnesilada de EGFP en marco de lectura con los dos primeros aminoácidos de DNGR-1. Por lo tanto, la expresión de EGFP marca las células que expresan DNGR-1 y está restringida en el bazo a células $CD8\alpha^+$ cDC (Sancho *et al.*, 2009). Consecuentemente, el tratamiento con Flt3L indujo una expansión de 10 veces de $EGFP^+$ DC en el bazo (esplenocitos) (Figura 14).

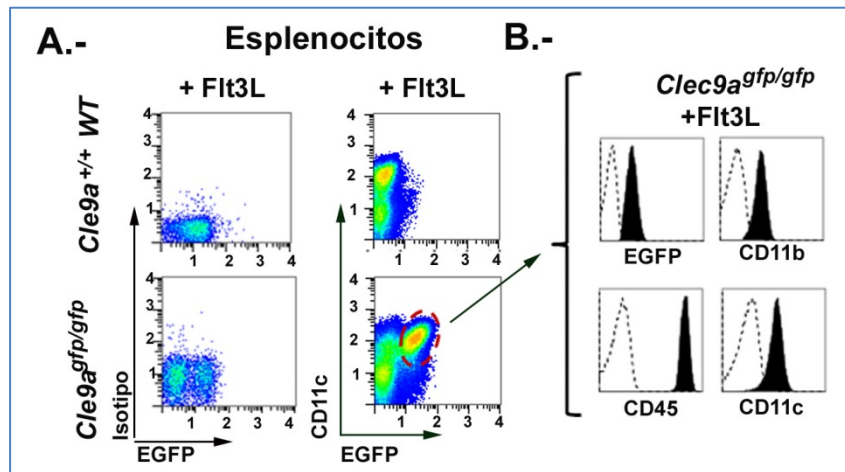


Figura 14. Resultados.- Expresión de DNGR-1-EGFP en el bazo de ratones *Clec9a^{+/+} wt* y *Clec9a^{egfp/egfp} knock out*. Los ratones *Clec9a^{+/+} wt* y *Clec9a^{egfp/egfp} knock out* se trataron con Flt3L durante 14 días, y se aislaron esplenocitos como se describe en Material y Métodos. Las células del bazo se tiñeron con anticuerpo anti-CD11c PE-Cy7 o el isotipo de control. Se identificaron células $CD11c^+$ DNGR-1- $EGFP^+$ y se analizaron adicionalmente con anticuerpos anti-CD11b APC-Cy7, anti-CD11c PE-Cy7 y anti-CD45 PE (panel A). Los histogramas representan la expresión de DNGR-1- $EGFP^+$ (EGFP), CD11b, CD45 CD11c (panel B). Los controles de isotipo están representados por las líneas de puntos. Los datos son un experimento representativo de 5 diferentes experimentos realizados. Estos animales se utilizaron para la identificación del parénquima mieloide cerebral y las células m/Ch analizadas en la Figura 15.

El análisis de citometría de células de BP y membranas m/Ch aisladas de ratones wt tratados con \pm Flt3L y ratones *Clec9a^{egfp/egfp}* reveló la expresión de EGFP en células $CD45^h$ en ambas preparaciones celulares. En BP hubo un aumento modesto pero significativo en el número de células $CD45^h EGFP^+$ (Figura 15, panel A), mientras que en las preparaciones m/Ch las células $CD45^h EGFP^+$ se incrementaron 10 veces con el tratamiento con Flt3L (Figura 15, panel B).

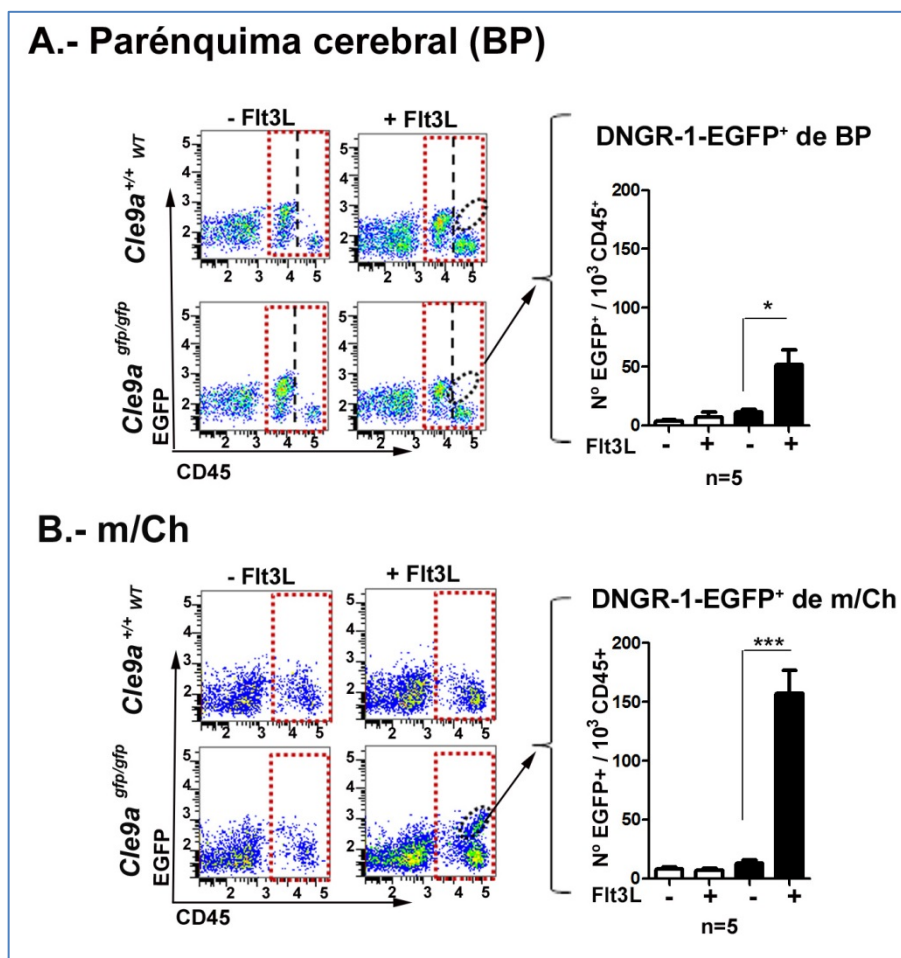


Figura 15. Resultados.- DNDR-1-EGFP⁺ en aislados de células cerebrales. Las células mieloides se aislaron a partir del parénquima cerebral (A) y membranas m/Ch (B) de *Cle9a*^{+/+} wt (barras blancas) y *cle9a*^{egfp/egfp} *knock down* (barras negras) que no fueron tratadas (-Flt3L) o tratadas con Flt3L (+ Flt3L) durante 14 días. Las gráficas de puntos de citometría de flujo muestran tinción con anticuerpo anti- CD45 APC de un experimento representativo de 5 realizados. Se muestran las ventanas correspondientes a células CD45⁺ totales (línea de puntos) y células CD45⁺ con alta intensidad (CD45^h; línea discontinua). Las regiones ovales demarcan la población de células CD45^h DNDR-1-EGFP⁺. Los gráficos de barras en A y B muestran números de células CD45^h DNDR-1-EGFP⁺ por 10³ células CD45⁺ de animales control (-Flt3L) y tratados (+Flt3L). Los datos son media \pm SEM de 5 experimentos independientes. Para obtener suficiente número de células, m/Ch aislados de dos cerebros se agruparon por cada condición.

Analizamos a continuación la expresión del antígeno MHC II en células EGFP⁺. Como control positivo, se analizó el aumento inducido por Flt3L en esplenocitos EGFP⁺, encontrando que todas las células CD45⁺DNDR-1-EGFP⁺ en el bazo fueron MHC II⁺ (Figura 16, panel A). El análisis mediante citometría de flujo de los aislados de BP y m/Ch mostró que las células DNDR-1-EGFP⁺ son también MHC II⁺ en el cerebro (Figura 16 panel B y C). Las células EGFP⁺ tienen una expresión baja de CD11b y corresponden a la subpoblación de CD45^hCD11b^{low} descrita en las figuras anteriores. Nuestra conclusión es que la expresión de DNDR-1 permite la discriminación adicional de una subpoblación de bDCs.

RESULTADOS

Los análisis de expresión de proteínas y ARNm de superficie indican que la mayoría de las células dependientes de Flt3L en el cerebro están localizadas en las membranas m/Ch. Para confirmar la naturaleza DC de la población de células dependientes de Flt3L en las membranas m/Ch, se analizó la expresión de ARNm de marcadores moleculares DC típicos de DCs DNGR-1⁺ (Poulin *et al.*, 2012; Poulin *et al.*, 2010) mediante RT-PCR cuantitativa. Las membranas del plexo coroideo procedentes de ratones tratados con Flt3L mostraron una mayor expresión de ARNm de los factores de transcripción Irf-8 (factor regulador de interferón 8) y Batf-3 (factor de transcripción de cremallera de leucina básico ATF-like 3) (Figura 16, panel C). También se detectó una mayor expresión de Cd103 (integrina alfa E (ITGAE)) una molécula expresada en células dendríticas de tejidos no linfoides; para más información ver (del Rio *et al.*, 2010).

Estos resultados forman parte de la publicación (Quintana *et al.*, 2015) y se acompañan en el Anexo.

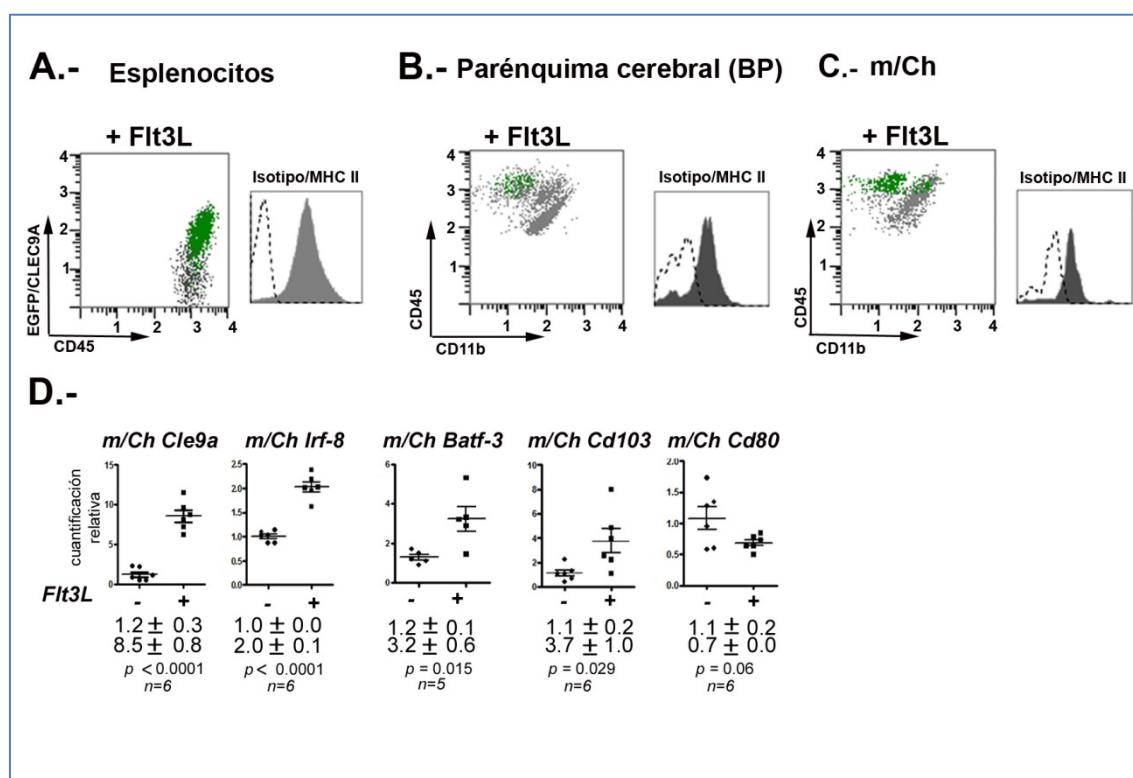


Figura 16. Resultados.- Expresión de MHC II en células cerebrales DNGR-1-EGFP⁺. Análisis por citometría de flujo de diagramas de puntos de células mieloide (CD45⁺) del bazo (A), parénquima cerebral (B) y m/Ch (C) de ratones Cle9a^{egfp/egfp} tratados con Flt3L. Las células se marcaron con los siguientes anticuerpos: CD45-PE-Cy7, CD11b-APC-Cy7 y MHC II (IA-IE)-APC. Las células DNGR-1-EGFP⁺ corresponden a la subpoblación CD45^hCD11b^{low} en células de parénquima cerebral (B) y membranas m/Ch (C) (línea punteada). Los histogramas muestran la tinción con MHC II en la superficie de las células DNGR-1-EGFP⁺ de CD45^hCD11b^{low} en animales tratados con Flt3L. Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados. (D) Análisis por RT-PCR de expresión de ARNm de Dngr-1, Batf-3, Irf-8, Cd103, Cd80 y Cd86 en membranas m/Ch de ratones control (-Flt3L) y tratados (+ Flt3L). *** p < 0,001 o ** p < 0,01 con respecto a m/Ch de animales control (n = 6).

Cambios asociados a edad en el envejecimiento normal y patológico

El segundo objetivo principal de esta Tesis ha sido el análisis de los cambios asociados al envejecimiento normal y patológico, centrándonos en el papel de las células mieloides. Para ello, hemos analizado la variación fenotípica y las diferencias en densidad de estas células, y en particular la microglía, en respuesta al envejecimiento.

Este objetivo se ha realizado principalmente mediante técnicas de inmunofluorescencia con marcadores de microglía como Iba-1. Iba-1 es un antígeno que ha sido usado ampliamente como marcador global de microglía en estado de reposo y activada (Bachstetter *et al.*, 2015). Por lo tanto, representa una excelente diana de marcaje para examinar cambios morfológicos en microglía (Jinno *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2011; Tynan *et al.*, 2010). Como ha sido anteriormente descrito (Kongsui *et al.*, 2014), se observa que la microglía presenta una morfología ramificada con procesos largos y finos y una distribución homogénea por todo el cerebro, muy semejante a la que se observaba en el BP de los ratones Csfr1-EGFP (Figura 13). Ante un daño o lesión (como lesión mecánica), la microglía cambia de morfología de forma drástica, engrosándose el citoplasma, acortándose los procesos y aumentando la expresión de este marcador. Esta respuesta ha sido definida como “activación de microglía”. Sin embargo, este tipo de cambios tan claros en lesión aguda son mucho más sutiles en el envejecimiento.

Para estudiar los cambios asociados a edad y en condiciones neurodegenerativas, se utilizó un modelo animal de envejecimiento acelerado, los SAM (senescence-accelerated prone mouse) y en concreto la cepa SAM P8 (P8), comparándolo con ratones de su mismo *background* genético pero con un envejecimiento normal, los SAM R1 (R1). Como control de cepa se utilizaron CD1-ICR. La cepa P8 es una cepa no modificada genéticamente y actualmente utilizada como modelo animal de Alzheimer asociado a envejecimiento (LOAD). Con un patrón de envejecimiento acelerado, simula mejor que los habituales modelos genéticos los casos de Alzheimer esporádico que constituyen el 95% de los casos (Pallàs, 2012). Estos resultados se han llevado a cabo también en ratones CD1-ICR adultos y envejecidos, para poder discernir entre los cambios fisiológicos asociados a edad y cuando son consecuencia de un proceso patológico.

1. Cambios asociados a edad en hipocampo.

1.1. Gránulos de PAS asociado al envejecimiento y procesos patológicos en hipocampo

En la bibliografía hay distintos métodos utilizados para la visualización de los acúmulos de beta amiloide ($A\beta$). Se utilizan colorantes aromáticos como tioflavina S, el rojo Congo o el NIAD-4, aunque el método habitual de tinción es el rojo Congo (Kumar *et al.*, 2006; Nesterov *et al.*, 2005). Varios estudios han descrito un incremento de tanto la proteína precursora de $A\beta$ ($A\beta$ PP) y derivados beta amiloides ($A\beta$) en el cerebro de los SAM P8, así como la presencia de placas o depósitos (Kawamata *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2000), similares a las placas amiloides humanas. Además, se ha descrito que los animales P8 y R1 envejecidos presentan acúmulos proteicos en el cerebro (Takeda, 2009). Sin embargo, no se han identificado estructuras con tinción positiva utilizando rojo Congo o tioflavina (Takemura *et al.*, 1993). Para verificar la existencia de acúmulos de proteínas $A\beta$, se han llevado a cabo tinciones de placas amiloides con tioflavina y rojo Congo sin un resultado claro.

Una de las complicaciones al usar cepas de ratones no transgénicas es la no presencia de placas amiloides como en transgénicos donde se sobreexpresa la forma humana de APP. La proteína APP de ratón se diferencia en varios aminoácidos de la humana, 3 de los cuales forman parte de la secuencia de $A\beta$ 1-42 (his13, arg5 y tyr10). Esta diferencia parece provocar una menor capacidad de agregación en el ratón, dado que, tanto la arg 5 como la his13, están implicadas en la agregación lateral de las protofibrillas que posteriormente formarían las placas amiloides (Fung *et al.*, 2004).

En la bibliografía se ha descrito que el envejecimiento del cerebro en ratones lleva a la progresiva aparición y expansión de unas estructuras granulares neurodegenerativas, referidas frecuentemente como gránulos de PAS por su tinción positiva con la tinción de ácido peryodico-shiff o periodic acid-Schiff (PAS) (Manich *et al.*, 2016). Los gránulos de PAS están principalmente presentes en el hipocampo, a pesar de ser descrito en otras áreas como corteza piriforme. Por tanto, esta tinción pudiera ser válida para la detección de posibles agregados de proteínas $A\beta$ en un modelo de ratón no transgénico (ver Materiales y Métodos) (del Valle *et al.*, 2009; Manich *et al.*, 2016).

En primer lugar, se realizaron las primeras tinciones en cortes de todo el cerebro, desde bulbo olfatorio hasta cerebelo, en un sentido rostrocaudal (Figura 17, panel A), detectando

RESULTADOS

presencia de acúmulos en hipocampo y corteza entorrinal. Los depósitos de PAS tienden a depositarse en grupos de 4 o más acúmulos juntos en forma de “nube de gránulos” (Figura 17, panel B), de mayor tamaño según avanza la edad. También se detecta marcaje de vasos sanguíneos sólo en ratones SAM P8 y en neuronas piramidales de hipocampo (sobre todo CA1).

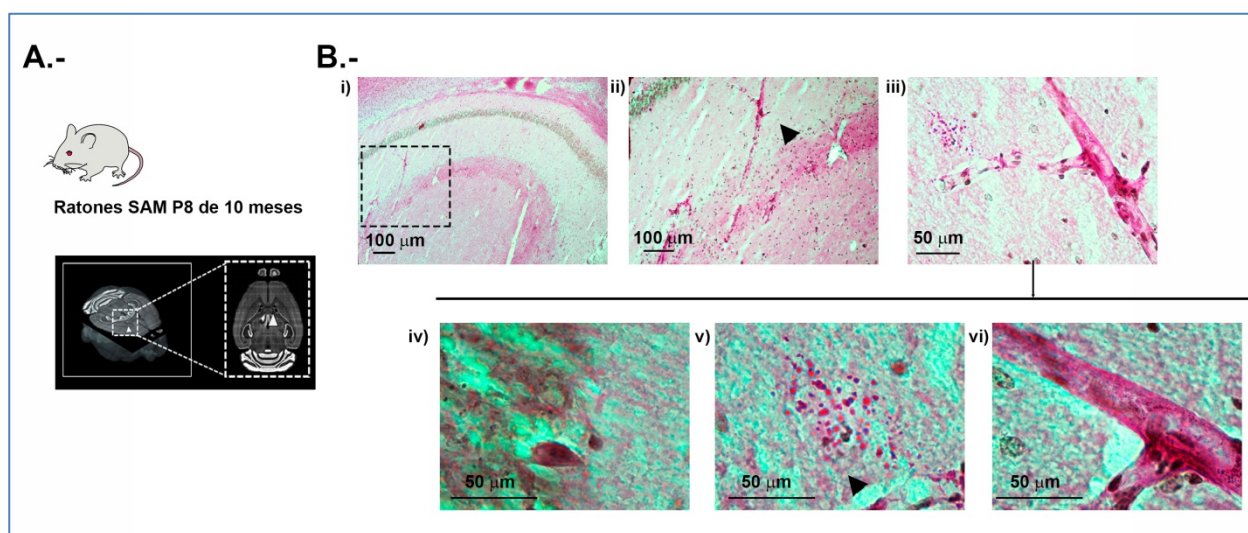


Figura 17. Resultados.- Tinción de PAS (Periodic Acid Schiff) en hipocampo de cerebro. (A) Imagen de una sección horizontal de cerebro, mostrando con flechas las principales regiones de aparición de los acúmulos de PAS en ratones SAM P8 de 10 meses (hipocampo y en menor medida corteza entorrinal). (B) Capturas de imágenes representativas de cerebro de ratones SAM P8 sobre cortes horizontales de criostato de 30 µm, mostrando imágenes a 10x (i), 20x(ii), 40x (iii) y 100x (iv-v). Se observan agrupaciones de gránulos PAS⁺ en el hipocampo y marcaje en células de la capa piramidal (iv) y vasos sanguíneos (vi). Las secciones fueron teñidas mediante reactivo de Schiff (rojo-rosado), mientras que los núcleos fueron teñidos con Hematoxilina (Azul-marrón). Las imágenes de secciones fueron obtenidas con el microscopio óptico Nikon Eclipse 50i H550S y fueron procesadas con ayuda del software NIS elements e ImageJ. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes.

El ratón B6.Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax (APP/PS1) es un modelo muy establecido de EA (Gengler *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2013; Radde *et al.*, 2006; Rupp *et al.*, 2011; Serneels *et al.*, 2009). Este modelo desarrolla placas amiloides de proteínas Aβ humana que se tiñen muy eficientemente con rojo Congo. Los cerebros de animales APP/PS1 de 13 m fueron cedidos por la Dra. Eva Carro del Hospital 12 de Octubre para ser utilizados como control positivo de la tinción de las placas de Aβ. Como se muestra en la Figura 18, se analizaron los depósitos PAS presentes en hipocampo de animales APP/PS1 (13 meses (m)) como control positivo; P8 de 2 y 10 m y R1 10 m como control de no envejecido. Como se observa en la Figura 18, se contabilizaron el número de clústeres PAS positivos por unidad de área. Como era de esperar, se observa un número de clústeres/mm², muy elevado en los animales APP/PS1 de 13 m (Figura 18, panel A). En los ratones SAM P8 de 10 m se observan un número de acúmulos muy significativo con respecto a los animales jóvenes de 2 m. Se

RESULTADOS

observan algunos gránulos de PAS en ratones control (R1) de 10 m, que aumentó con la edad (14 m, datos no mostrados). Estos datos han sido cuantificados en la Figura 18, panel B.

Por lo tanto, comparando el número de clúster, tanto ratones P8 como APP-PS1, estos clústeres se encuentran principalmente slm, sr, sp y so de CA1 y CA3, preferentemente en hipocampo dorsal.

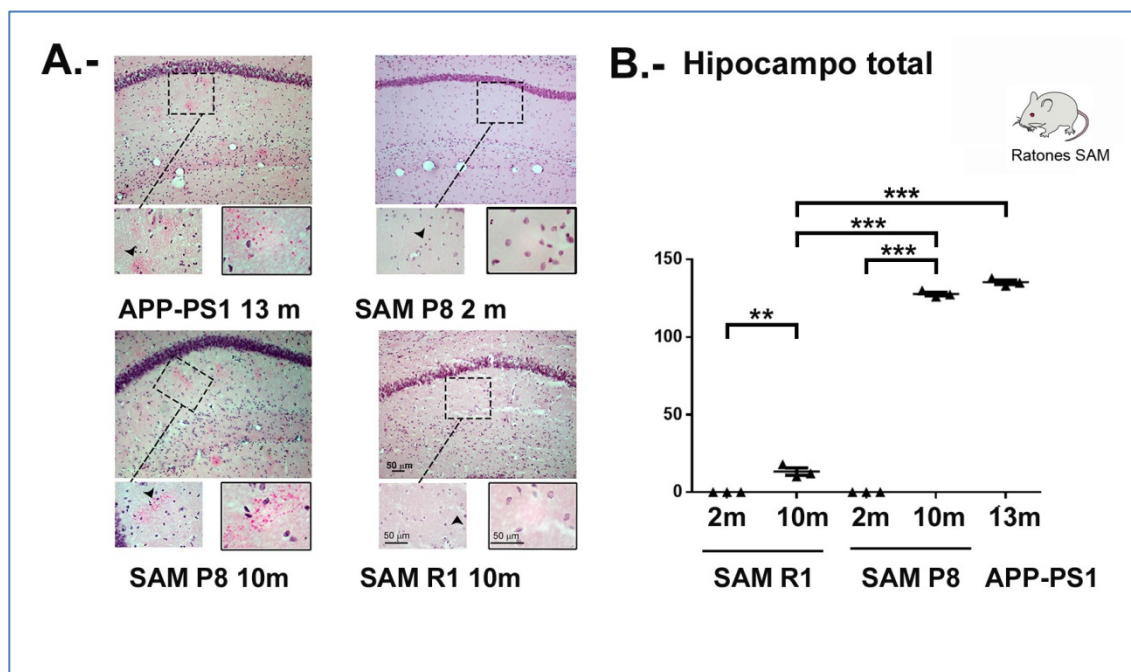


Figura 18. Resultados.- Análisis de acúmulos de PAS en ratones SAM asociado al envejecimiento. (A) Capturas representativas de regiones del hipocampo en ratones R1 y P8 de 2 y 10 meses (m) y ratones APP-PS1 de 13 m, mostrando el marcaje de gránulos de PAS positivos. (B) Cuantificación de la densidad de acúmulos de PAS. Las secciones fueron teñidas mediante reactivo de Schiff (rojo-rosado) y los núcleos con Hematoxilina (Azul-marrón). Las imágenes de secciones coronales de criostato (30 μ m de grosor) fueron obtenidas con un objetivo de 20x (40x y 100x, de izquierda a derecha para los cuadros de detalle), con el microscopio óptico Nikon Eclipse 50i H550S y procesados con ayuda del software *NIS elements* e *ImageJ*. *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$ con respecto a los acúmulos de PAS/mm² (n=3♂). Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes.

1.2. Cambios en la densidad de microglía asociado a edad y envejecimiento en hipocampo

Una de las primeras regiones afectadas en la EA es el hipocampo (véase Introducción). El hipocampo es una estructura anatómica fácil de reconocer y localizar para llevar a cabo estudios de estereología y conteo de células de una manera estandarizada. Además, se ha descrito que es más susceptible a procesos neurodegenerativos (Fuster-Matanzo *et al.*, 2011).

Se realizaron inmunofluorescencias con el marcador Iba-1 en cortes de cerebros de

RESULTADOS

ratones de la cepa P8 y su control R1 a los 2, 10 y 14 m de edad, donde el envejecimiento prematuro de la cepa P8 es fácilmente apreciable en el fenotipo externo de los animales (Figura 19, panel A).

El análisis del número de células Iba-1⁺ en el hipocampo total se muestra en las Figuras 19 y 20. En consonancia con los resultados obtenidos en modelos de envejecimiento normal (ver Introducción), se observa un aumento significativo del número de células Iba-1⁺ en los animales envejecidos de 14 m, tanto de la cepa P8 ($p < 0,01$) como en la cepa R1 ($p = < 0,001$) como control de envejecimiento normal (Figura 19, panel B). Sin embargo, este aumento de Iba-1⁺ entre animales de 2 m y 10 m no fue estadísticamente significativo cuando se valoró el hipocampo completo en ambos genotipos (Figura 20, panel A).

Los resultados muestran también diferencias significativas en la densidad de microglía entre R1 y P8 desde los 2 m de edad, observándose menor densidad de microglía a los 2 m en los P8 con respecto a los R1 ($p < 0,05$). Estas diferencias entre R1 y P8 permanecen estables a los 10 y 14 m, como se muestra al evaluar el aumento de la densidad de microglía en R1 y P8 (Figura 19, panel B). Este fenómeno no ha sido descrito con anterioridad; sin embargo el número de veces que aumentan las células Iba-1⁺ de los animales jóvenes con respecto a los envejecidos se mantiene constante en ambos fenotipos: P8 y R1 (Figura 19C y 20A).

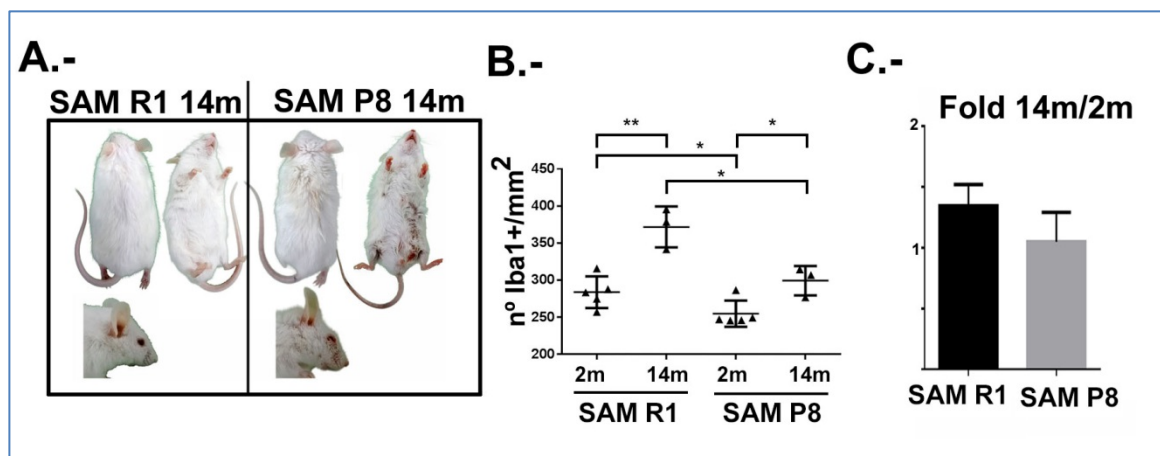


Figura 19. Resultados.- Evaluación de la densidad de microglía en el hipocampo de ratones SAM de 2 y 14 meses (m). (A) Capturas de imágenes representativas de ratones SAM a los 14 m, mostrando la incipiente alopecia, lesiones cutáneas y alrededor de los ojos. Las capturas son imágenes representativas de un experimento de $n=3$. (B) Cuantificación de la microglía, analizando el número total de células Iba-1⁺ en el hipocampo total (CA1 y DG). (C) *Fold change* de todo el hipocampo en ratones SAM R1 y P8 de 2 a 14 m. Las áreas usadas para el conteo fueron procesadas y evaluadas con *ImageJ*. *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$ con respecto a células Iba-1⁺/mm² en parénquima cerebral ($n=3$ ♂).

RESULTADOS

La mayoría de autores (Allen Institute for Brain Science, consultado en 2016-2017), distinguen entre de 2 regiones principales: el hipocampo propio (cornu ammonis, CA) y el giro dentado (DG). Ambas regiones (CA y DG) poseen propiedades anatómicas, moleculares y biofísicas distintivas (Burger, 2010), (Figura 20, panel A). El hipocampo propiamente dicho, a su vez, contiene 3 subregiones (regiones de CA1 a CA3). En el CA1, a su vez, consiste de 3 capas distintas: estrato *oriens* (so), estrato piramidal (sp), estrato radiado (sr) y estrato lagunoso-molecular (slm), observando de más externo a más interno (Figura 18).

En la CA1, las regiones donde se localizaron cambios significativos entre R1 y P8 desde los 2 m son estrato *oriens*, estrato piramidal y estrato lagunoso-molecular. (Figura 20, panel A i a iii). Se ha descrito con anterioridad, que existe diferente susceptibilidad a la edad y a procesos neurodegenerativos en las distintas zonas del hipocampo evaluadas (Flood *et al.*, 1987; Markham *et al.*, 2005; Pyapali y Turner, 1996). Por ello, hemos analizado el número de Iba-1⁺ existentes en las distintas regiones del hipocampo y se dividió el análisis en CA y DG. De las regiones de CA, se eligió CA1 por haberse registrado los cambios más robustos de microglía en enfermedades neurodegenerativas (Burger, 2010). La región CA1 presenta las mayores diferencias en el número de células Iba-1⁺ entre los R1 y P8 de 2 m (Figura 20, panel B). Sin embargo, en el Giro Dentado (DG) apenas existen diferencias en cuanto al número de Iba-1⁺ a los 2 m de edad (Figura 20, panel B). El resto de regiones analizadas no mostraron diferencias significativas (datos no mostrados), aunque se observó la misma tendencia general de menor densidad de microglía en los P8 desde los 2 m de edad hasta 14 m.

El DG consta de 3 regiones distintas: capa molecular (mo), polimórfica (po) y granular (sg). Los cambios entre ratones R1 y P8 sólo se constatan a partir de los 10 m, en especial en la capa polimórfica (Figura 20, panel C iv).

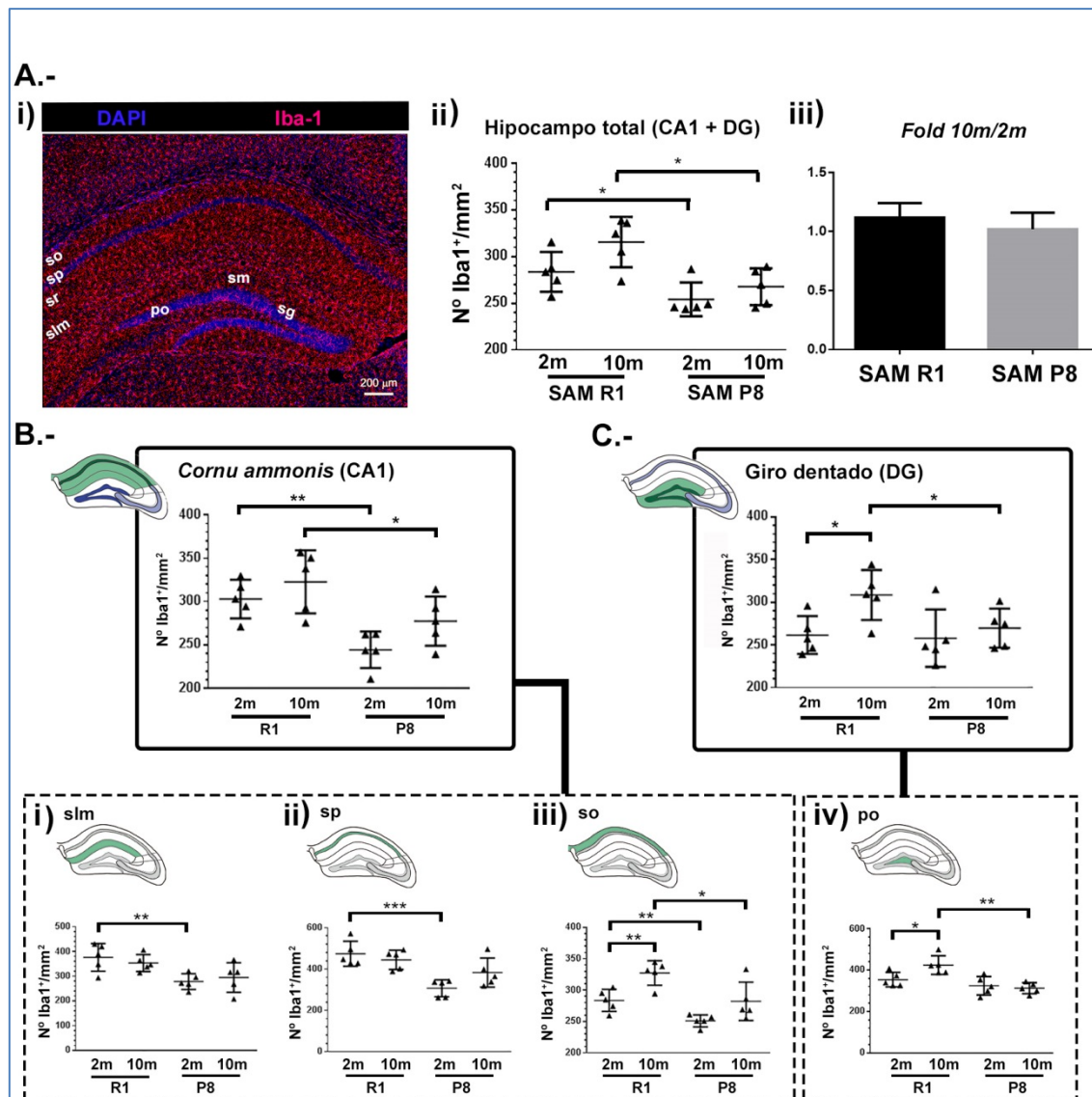


Figura 20. Resultados.- Evaluación de la densidad de microglía en el hipocampo de ratones SAM de 2 y 10 meses. (A) Mapa representativo del hipocampo (i), mostrando la expresión de células mieloides de parénquima en ratones SAM e indicando las regiones usadas para el conteo. (ii) Cuantificación de la microglía, analizando el número total de células Iba-1⁺ en el hipocampo total (CA1 y DG). (iii) *Fold change* de todo el hipocampo en ratones SAM R1 y P8. (B) Cuantificación de la microglía, analizando el número de células Iba-1⁺ en CA1 de ratones SAM, mostrando la cuantificación en las regiones donde se encontraron diferencias significativas (i-iii). (C) Cuantificación de la microglía, analizando el número total de células Iba-1⁺ en el DG, mostrando la cuantificación donde se encontró diferencias significativas (iv). Las secciones coronales de criostato a 30 μm fueron teñidas con anticuerpo marcador de macrófagos/microglía Iba-1 (rojo) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes a 40x (zoom digital 1,7x) fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 TCS y las áreas fueron procesadas y evaluadas con *ImageJ*. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes. ***P ≤ 0.001; **P ≤ 0.01; *P ≤ 0.05 con respecto a células Iba-1⁺/mm² en parénquima cerebral (n=5 ♂). Abreviaturas: CA1, *cornu ammonis* 1; so, estrato *oriens*; sp, capa piramidal; sr, estrato radiado; slm, estrato lagunoso-molecular; DG, giro dentado; po, capa polimórfica; sg, capa granular; mo, estrato molecular.

2. Análisis de microglía hipertrófica y clústeres en ratones SAM P8

En el proceso de envejecimiento la microglía puede adquirir también distinta morfología y/o agruparse a modo de clústeres de 3 o más células de microglía solapadas (ver Introducción). Se visualizan principalmente en regiones caudales y basales del cerebro, aproximadamente de -2,54 mm a -3,80 mm de Bregma y abarcando regiones como hipocampo ventral, tálamo, formación reticular y sustancia *nigra*. Para facilitar los análisis del número de densidad celular, el cerebro se ha dividido en estas tres zonas, que se señalan en el esquema de la Figura 21A, panel i con las letras en azul A (estrato *oriens*), B (tálamo y formación reticular) y C (sustancia *nigra*, marcado en torno a las neuronas tirosina hidroxilasa (TH) positivas, datos no mostrados). En la Figura 21A, panel ii se muestran imágenes representativas (n=5), de los clústeres Iba-1⁺ en la formación reticular en ratones SAM P8 de 2 y 10 m, y cómo aumentan con la edad. A continuación, se contaron manualmente el número de clústeres existentes en cada una de estas regiones, en animales P8 y R1 de 2 m y 10 m como se muestran en la Figura 21, panel B. En los animales P8 de 10 m hay un aumento significativo del número de clústeres cuando se comparan con animales jóvenes (2 m) del mismo fondo. Este aumento es especialmente notable en la formación reticular, donde el aumento comparado con el número de agrupaciones en el P8 de 2 m es significativo ($p < 0.001$), a pesar de los pocos animales evaluados (Figura 21B, panel ii). En la Figura 21, panel C se muestra en más detalle la morfología de los clústeres en las distintas zonas del cerebro anteriormente señaladas (Figura 21, panel C).

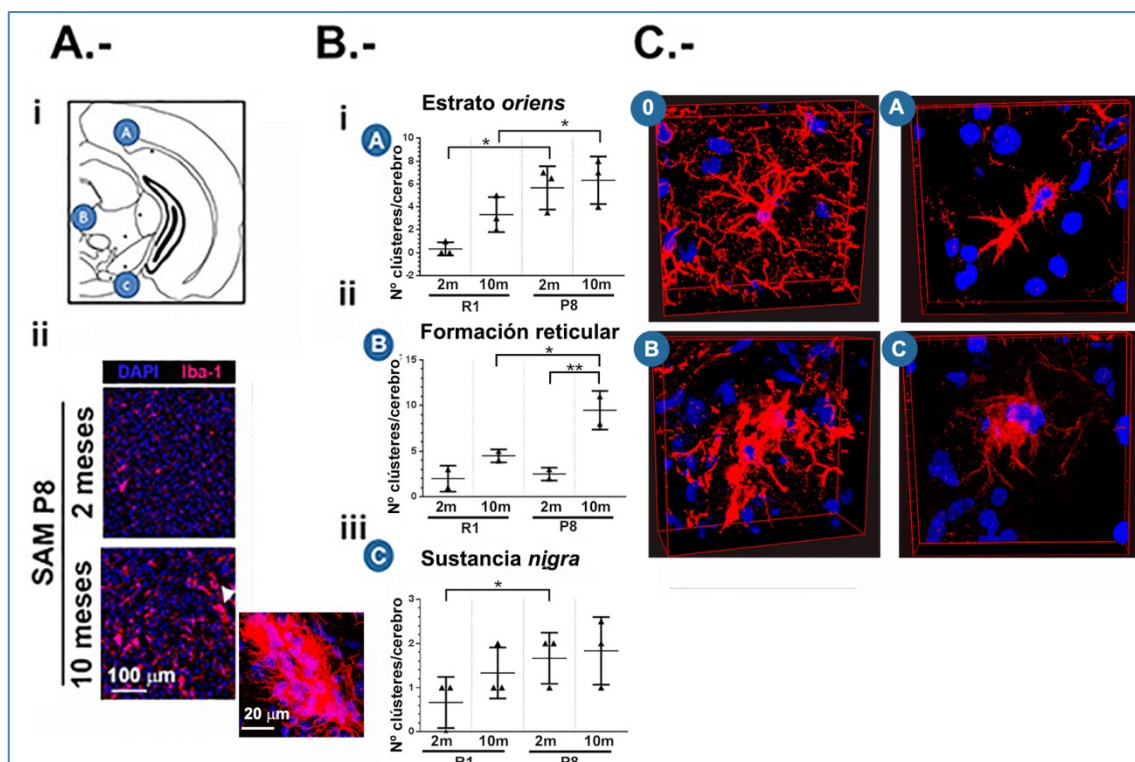


Figura 21. Resultados.- Análisis de los clústeres de microglía en cerebro de ratones SAM. (Ai) Esquema de una sección coronal del cerebro mostrando las principales regiones de aparición de los clústeres de microglía asociado a la edad (letras en azul). (Aii) Mapas representativos a 40x (Zoom digital 1,7) de Iba-1⁺ en la formación reticular de cerebros SAM P8 de 2 y 10 meses (m), tomados con un objetivo de 40x (Zoom digital 1,7). (B) Cuantificación de los clústeres de microglía (Iba-1⁺) en cerebros de R1 y P8 de 2 y 10 m en las regiones indicadas en Ai. (C) Reconstrucción 3D a partir de imágenes tomadas con un objetivo de 63x (Zoom digital 3x), mostrando la apariencia de los clústeres de microglía según las regiones, indicado en Ai. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia SP5 TCS y procesado con *ImageJ*, usando el plugin high-level 3D visualization framework para las reconstrucciones 3D. Los cerebros de ratón P8 y R1 fueron teñidos con Iba-1 para microglía (rojo) y DAPI para los núcleos (azul). *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$ ($n=5$) con respecto al n° de clústeres/cerebro de ratón ($n=5$ ♂).

Durante el análisis de estos datos, se observó diferencias en la morfología de las células Iba-1⁺ encontradas en los clústeres. En la Figura 21, panel C se muestra una reconstrucción 3D de una célula de microglía con morfología normal, altamente ramificada (cuadro 0). En la zona de los clústeres (B y C), la microglía presenta una morfología hipertrofiada de 3 o 4 células con forma ameboide/globosa y en red, más similar a lo descrito como microglía activada e hipertrófica (Aloisi, 2001; Bachstetter *et al.*, 2015b; Hernandez-Ontiveros *et al.*, 2013; Loane y Byrnes, 2010; Walker y Lue, 2015; Xiong *et al.*, 2011). En hipocampo o corteza prefrontal se observó mayor presencia de microglía con una morfología menos ramificada y fragmentada y/o atrofiada formando “cuentas”, más acorde con lo descrito sobre todo en humanos como “microglía distrófica” (Streit *et al.*, 2009). La intensidad de la tinción Iba-1, en estas regiones hay algunas células que presentan una mayor intensidad (descrito como morfología reactiva), pero no es generalizado. Por lo general, en las regiones

como hipocampo, parecen predominar ambos tipos de morfología, algunas células “reactivas” junto a otras con morfología desramificada/distrófica. El significado funcional de esta condición desramificada/distrófica está aún por dilucidar.

3. Análisis de microglía senescente en el SAM P8

Uno de los hallazgos más llamativos asociados a los ratones P8 envejecidos ha sido la presencia de la denominada “microglía distrófica”. Según los trabajos del grupo de Streit (ver Introducción), esta microglía distrófica podría tratarse de células en un proceso de senescencia o muerte celular. Para analizar si este era el caso para los clústeres de microglía que habíamos observado, se utilizaron dos tipos de marcajes de senescencia: mediante la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia (Figura 22 y 23) y daño celular con γ H2AX (Figura 24).

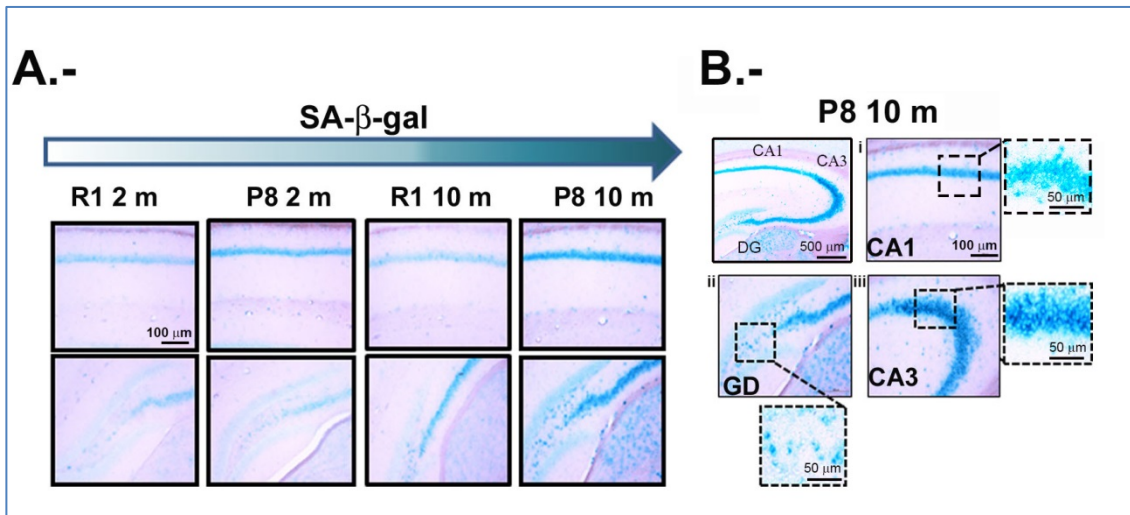


Figura 22. Resultados.- Tinción para β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). (A) Imágenes representativas de hipocampos de ratones SAM de 2 y 10 meses, tomadas con un objetivo de 20x. (B) Regiones donde se registró mayor intensidad de SA- β -gal⁺ en hipocampo de P8 de 10 m. En el mapa mostrado (usando un objetivo de 4x), se muestra que mayor intensidad de SA- β -gal en la región de la capa de neuronas piramidales de CA1 (i) y CA3 (iii), a pesar de mostrarse algo de tinción inespecífica. También se registra algo de marcaje en la capa polimórfica del giro dentado (ii). Los paneles i-iii fueron tomados con un objetivo de 20x, mientras que para los cuadros de detalle se usaron un objetivo de 40x. Las imágenes fueron obtenidas, usando el microscopio óptico Nikon Eclipse 50i H550S y fueron procesadas con ayuda de los softwares NIS elements e *ImageJ*. Las imágenes son representativas de un experimento de n=3 ♂ en diferentes localizaciones del cerebro. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes. Abreviaturas: CA1, *cornu ammonis* 1; DG, giro dentado; CA3, *cornu ammonis* 3

Como se indica en Materiales y Métodos, se ha descrito un ensayo cromogénico que permite la identificación de senescencia replicativa basado en la detección de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal). Hipocampos de R1 y P8 de 2 y 10 m fueron teñidos y evaluados mediante estas tinciones. Como se muestra en la Figura 22, se observó un incremento gradual con la edad tanto en ratones R1 como P8 (Figura 22, panel A). No

RESULTADOS

obstante, los ratones P8 mostraron una actividad muy elevada y específica a los 10 m, estos cambios se evaluaron con más detalle en las distintas regiones siendo muy notables en el GD (Figura 18, panel B). Otras regiones sensibles en el envejecimiento no pudieron ser evaluadas debido a la presencia de mucha señal inespecífica que enmascaraba los resultados (Datos no mostrados).

El siguiente objetivo es dilucidar si estas células que presentan altos niveles de SA- β gal coincidían con la microglía distrófica que habíamos encontrado en estas regiones. Se llevaron a cabo tinciones de estos cortes teñidos con una tinción con Iba-1 mediante inmunohistoquímica, como se describe en Materiales y Métodos. Se observó que no había co-localización de las señales de x-gal e Iba-1 en parénquima cerebral (Figura 23). X-gal permanece en ocasiones en las inmediaciones de las células de microglía. En membranas tampoco se encontró co-localización de la señal. Los plexos coroideos y las meninges fueron difíciles de analizar debido a la elevada tinción no específica de x-gal (datos no mostrados). En estos momentos no podemos decir cuál es el origen celular de esta señal, y estudios más detallados a este respecto serán necesarios.

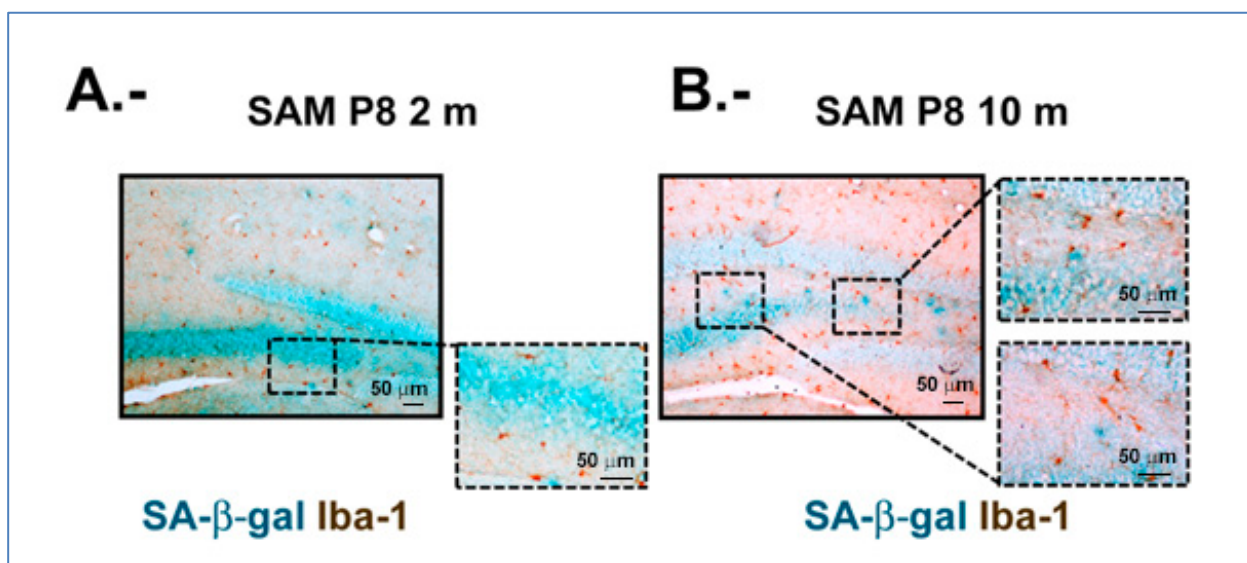


Figura 23. Resultados.- Co-localización de Iba-1 y β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). Imágenes de hipocampo teñidos con Iba-1 (marrón) y actividad SA- β -gal (azul) de ratones SAM P8 de 2 meses (m) (A) y de 10 m (B). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio óptico Nikon Eclipse 50i H550S y fueron procesadas con ayuda de los softwares NIS elements e *ImageJ*., usando un objetivo de 20x y de 40x para los cuadros de detalle. Las imágenes son representativas de un experimento de n=3 ♂. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes.

Cuando existe un daño al ADN, se forman roturas de doble cadena (DSBs), que seguidas por la fosforilación de la Histona 2AX (H2AX) (Sastre-Moreno *et al.*, 2017). Por lo tanto, para evaluar la existencia de daño a nivel de DNA, se realizaron tinciones de los

RESULTADOS

cerebros de ratones P8 de 10 m con anticuerpos que reconocen el marcador γ H2AX (Figura 24). Los análisis muestran que hay células con daño celular en SAM P8 de 10 m, y por tanto positivas para el marcador γ H2AX (Figura 24, panel A).

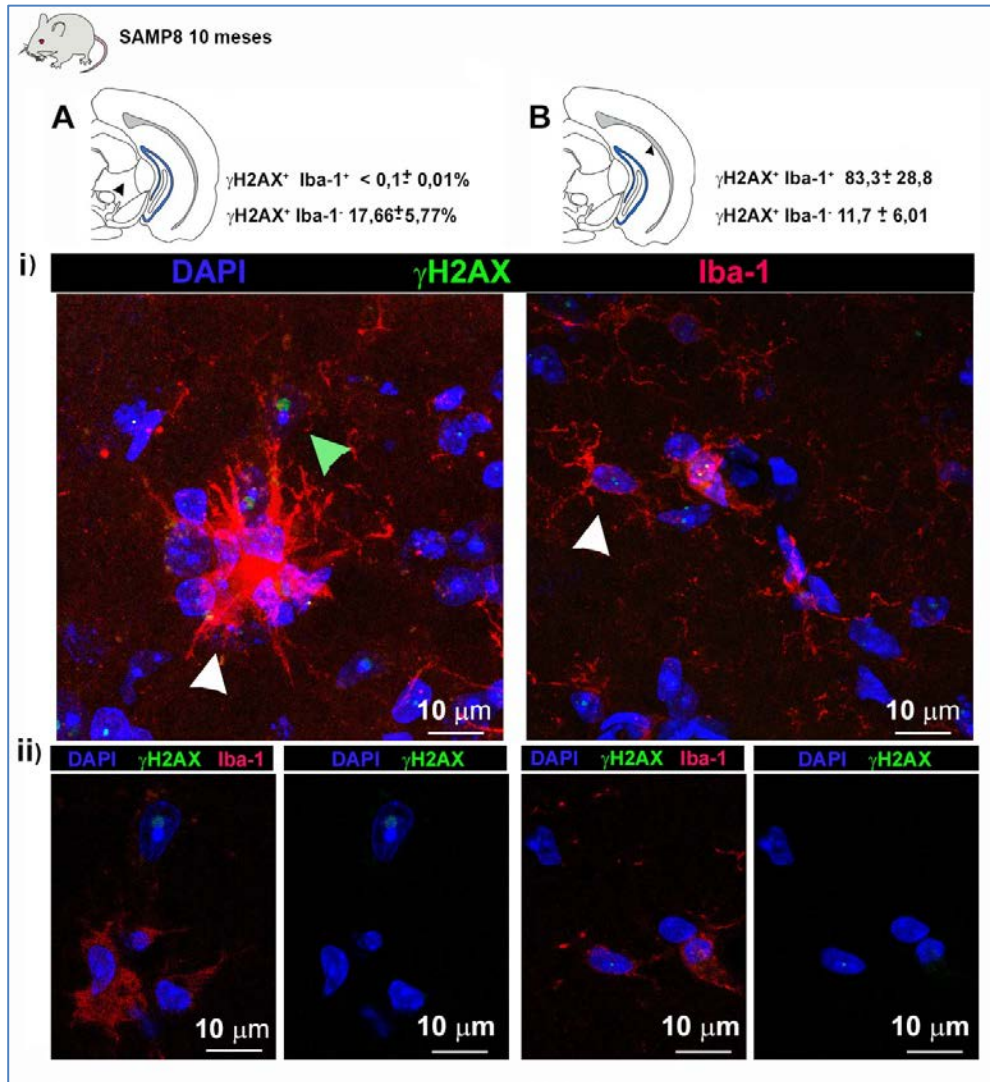


Figura 24. Resultados.- Tinción de γ H2AX en microglía de hipocampo. (A) Imagen representativa de la formación reticular de cerebro de ratón SAM P8 de 10 meses, mostrando los clústeres de microglía Iba-1⁺ que no son positivas para γ H2AX, en las inmediaciones de células γ H2AX⁺, señalado con la flecha verde (B) Imagen representativa de hipocampo de cerebro de ratón SAM P8 de 10 meses (estrato *oriens* de CA1), mostrando microglía Iba-1⁺- γ H2AX⁺ en hipocampo. La imagen proyección máxima se muestra en i), mientras que en ii) se muestra las capturas en z (z-stack) de la imagen de proyección máxima. La microglía/macrófagos están teñidos con Iba-1 (Rojo), la tinción con γ H2AX (verde) y los núcelos con DAPI (azul). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo de 63x con el microscopio confocal de fluorescencia SP5 TCS y procesado con *ImageJ*. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes. Las imágenes son representativas de un experimento de n=3 ♂.

No se vio marcaje específico en los clústeres de microglía; aparecen células con daño celular (γ H2AX⁺ba-1⁻ 17,66±5,77%), siendo englobadas con frecuencia por microglía que permanece en la mayoría de los casos, no positivas para γ H2AX (γ H2AX⁺Iba-1⁺ < 0,1±0,01%).

Sin embargo, en otras regiones de hipocampo, se observa presencia de daño celular tanto en microglía (γ H2AX⁺Iba-1⁺ 83,3 \pm 28,8%) como en células de alrededor (γ H2AX⁺Iba-1⁻ 11,7 \pm 6,01%). Las células no presentan una morfología hipertrofiada pero con frecuencia muestran signos de morfología distrófica (Figura 24, panel B).

Es interesante remarcar la no evidencia de cambios morfológicos llamativos y la presencia de muchas células con daños en el núcleo, no positivas para γ H2AX. Por lo tanto, podemos concluir que la microglía de los clústeres no es positiva para este marcador.

4. Evaluación funcional de las células de microglía en el modelo de envejecimiento SAM P8

Uno de los cambios descritos asociados a la edad y a procesos neurodegenerativos, ha sido que la microglía envejecida responde de forma exacerbada y disfuncional a cualquier tipo de daño o lesión, ligado a una pronunciada muerte neuronal y alteraciones cognitivas. Este cambio o estado *primed* de la microglía viene asociado, por ejemplo, con un aumento de marcadores como MHC II, que sólo se expresan en células presentadoras de antígeno (Ting y Trowsdale, 2002). Paralelo a este cambio fenotípico de la microglía, una de las hipótesis para explicar gran parte de los cambios sucedidos con la edad y cuando esta se agrava en condiciones neurodegenerativas, es la existencia de un ambiente general inflamatorio en el SNC que se escapa del control hacia la regulación. La microglía, como principal célula del sistema inmune innato tiene un papel esencial en este proceso (más información en, (Norden y Godbout, 2013).

4.1. Evaluación de células presentadoras de antígeno (MHC II⁺) en el modelo de envejecimiento SAM P8

Para visualizar posibles cambios fenotípicos de la microglía hacia un estado más activado, analizamos la presencia de células MHC II⁺ en el modelo de envejecimiento mediante inmunofluorescencias. Para ello, se compararon los niveles de expresión de MHC II⁺ en animales jóvenes (2 m) y envejecidos (10 m). En este punto nos encontramos que hay una diferencia en el haplotipo entre los animales P8 (H-2Kk) y su control R1 (H-2Ks) (Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011), este último haplotipo no es reconocido por el anticuerpo que habíamos puesto a punto anteriormente en los análisis realizados en los animales sanos (Figura 11). Por lo tanto, a la espera de encontrar una estrategia para visualizar los niveles de MHC II en los animales R1, hemos utilizado la cepa CD1-ICR, que ha sido utilizada como control de

RESULTADOS

envejecimiento normal en otros trabajos (Díaz-Moreno *et al.*, 2013). Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 25. En concordancia con los resultados mostrados en la Figura 11, las células MHC II⁺ se encuentran principalmente en las membranas meníngeas y en los plexos coroideos. Para hacer las cuantificaciones entre los distintos individuos se optó por evaluar sólo las presentes en los plexos coroideos. Se tomaron distintos cortes para analizar el número total de células en esta localización, como se muestra en Figura 25, panel A. Se realizaron dobles inmunofluorescencias con anticuerpos frente a Iba-1, como marcador de la microglía y anti-MHC II que reconoce el MHC II de ambas cepas, en cortes de cerebro de animales de 2 m y 10 m de las cepas SAM P8 y CD1-ICR como control. En la Figura 25 panel A, se muestra una imagen representativa de esta inmunofluorescencia a pequeño aumento, los datos obtenidos en plexos coroideos se analizaron y se muestran en la Figura 25, panel B.

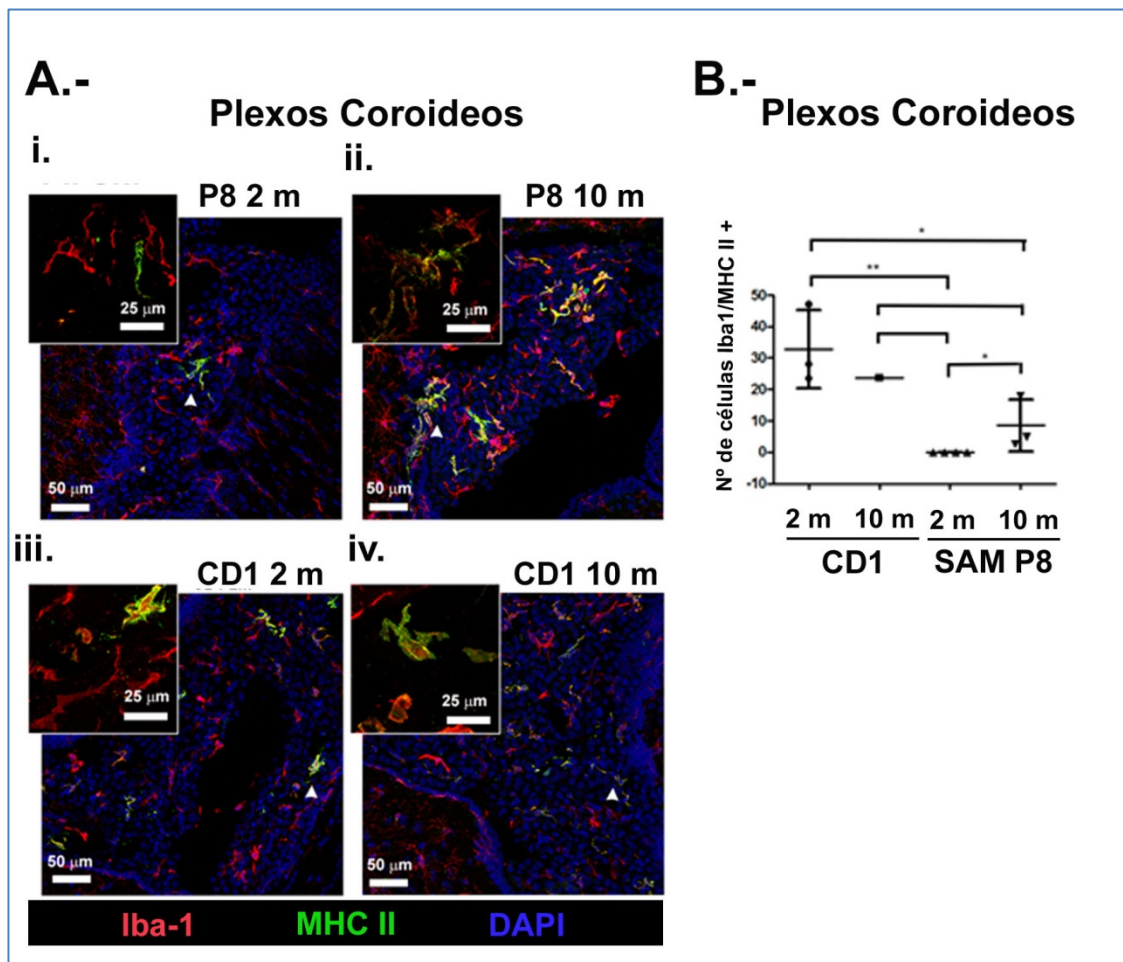


Figura 25. Resultados.- Expresión de MHC II en plexos coroideos de ratones SAM P8 y CD1-ICR. (A) Imágenes representativas de tinción con Iba-1 (rojo), MHC II (verde) y DAPI (azul) de secciones coronales de cerebro de ratón SAM P8 (i-ii) y CD1-ICR (iii-iv) a los 2 y 10 m, mostrando los plexos coroideos. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido SP5 Leica TCS con un objetivo de 40x y 63x (Zoom digital 3x). Las capturas son imágenes son representativas de un experimento de n=5 ♂. Las escalas de las barras están incluidas en las imágenes. (B) Análisis del número de células Iba-1⁺-MHC II⁺ sobre el total de células Iba-1⁺ (n=5 ♂).

Una de las conclusiones que podemos sacar de estos resultados es que todas las células MHC II⁺ contabilizadas eran a su vez Iba-1⁺, aunque la mayoría de las Iba-1⁺ que no son MHC II⁺, como cabría de esperar. En estos análisis no se han observado una correlación clara o “patrón de activación” con cambio de morfología en las células Iba-1⁺ que sean a la vez MHC II⁺ (Figura 25, panel A). Los análisis del número de células Iba-1⁺ MHC II⁺ presentes en los plexos coroides de los animales CD1-ICR y P8 de distintas edades se representan en la Figura 25, panel B. Nuestros datos indican que hay un mayor número de células MHC II⁺ en los animales P8 envejecidos con respecto a los de 2 m ($p < 0,05$). Los animales CD1-ICR de 10 m no presentaron un aumento del número de célula MHC II⁺, aunque este dato era esperable, ya que un ratón CD1-ICR de envejecimiento normal, no se le considera viejo hasta pasados los 18 m. Estos animales están en el estabulario y aún no han podido ser analizados.

Lo resultados muestran que los animales P8 de 2 m, cuando se comparan con el control CD1-ICR de 2 m, tienen un número menor de células Iba-1⁺ en general, semejante a los datos que habíamos obtenido anteriormente comparando células Iba-1⁺ en los animales P8 y R1 jóvenes (Figura 14), corroborando el menor número de células de microglía existentes en los ratones P8. Paralelamente, los niveles de células Iba-1⁺ MHC II⁺ a los 2 y 10 m era claramente mayor ($p < 0,01$) en los animales CD1-ICR que en los P8. En los CD1-ICR a los 14 m, el porcentaje de células Iba-1⁺-MHC II⁺ parece disminuir pero sigue siendo mayor que los P8 a los 10 m (datos no mostrados y pendientes de conclusión). En cuanto a la microglía de parénquima, a pesar de la apariencia de microglía con morfología activada y/o alterada, en ningún caso se encuentra doble marcaje de Iba-1 y MHC II en las células mieloides de BP (datos no mostrados).

4.2. Análisis de citoquinas inflamatorias en el modelo SAM P8 asociadas a envejecimiento

Como hemos mencionado anteriormente, el P8 es un modelo de envejecimiento prematuro. Es sabido que la inflamación tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (ver Introducción). Por lo tanto, nuestra siguiente pregunta ha sido evaluar los niveles de citoquinas inflamatorias en animales P8 jóvenes (2 m) y envejecidos (10 m) comparados con su cepa control, R1 de ambas edades. Para ello, hemos aislado las células del parénquima cerebral (BP) y las membranas m/Ch, analizando los niveles de las citoquinas antes mencionadas en estos animales mediante RT-PCR cuantitativa.

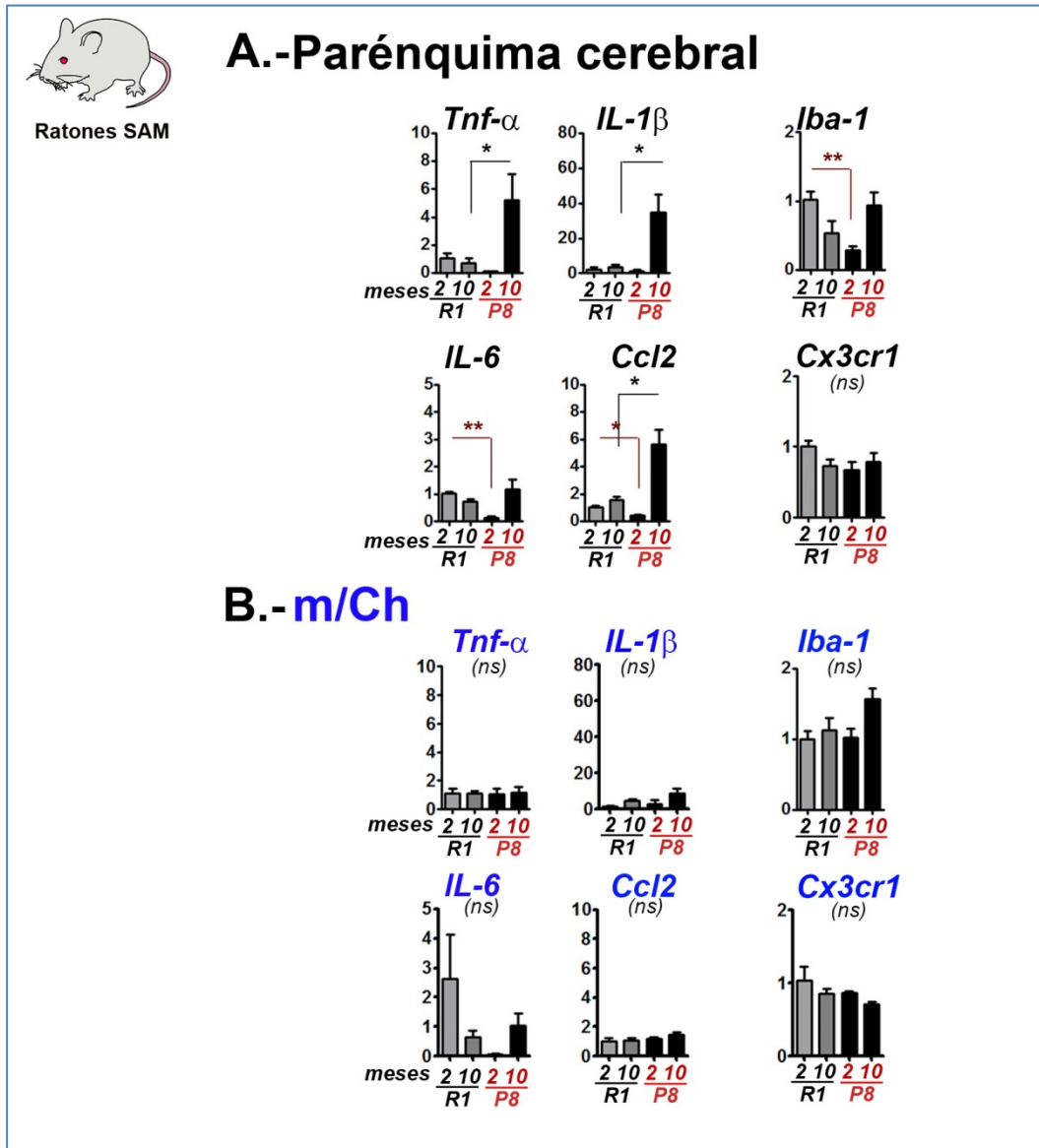


Figura 26. Resultados.- Perfil de expresión génica en células mieloides de ratones SAM. (A) Perfil de expresión génica de células mieloides de parénquima, aisladas mediante gradiente de Percoll en ratones SAM de 2 y 10 meses (m), evaluando la expresión de citoquinas proinflamatorias (*Tnf-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *Ccl-2*) y marcadores de macrófagos/microglía (*Iba-1* y *Cx3cr1*) mediante qPCR. (B) Perfil de expresión en plexos coroideos y meninges (m/Ch) en ratones SAM P8 y R1 de 2 y 10 m, evaluando la expresión de citoquinas proinflamatorias (*Tnf-α*, *IL-1β*, *IL-6*, *Ccl-2*) y marcadores de macrófagos de parénquima o microglía (*Iba-1* y *Cx3cr1*). La distribución de los datos en las gráficas se representa como la media \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Nota: Todos los gráficos están en escala logarítmica (unidades relativas).

Como mostramos en la Figura 26, los niveles de *Tnf-α*, *IL-1b* y *Ccl-2* aumentan significativamente en las muestras de BP de animales P8 de 10 m, pero no en las muestras de m/Ch. Los cambios en los niveles de *IL-6* sólo fueron significativos en BP de P8 de 2 m frente a su control R1 de 2 m, en los cuales se observó una disminución. Para normalizar el número de células de microglía obtenidos en cada grupo, medimos los niveles de dos marcadores de microglía: *Iba-1* y *Cx3cr1*. Como se indica en la Figura 26, los únicos cambios significativos han

sido en la disminución de la expresión de Iba-1 en los animales P8 de 2 m. Estos datos concuerdan con los análisis realizados por inmunofluorescencia (Figura 17), donde se veía un menor número de células Iba-1⁺ en los animales P8 de 2 m. Sorprendentemente, la cantidad de ARNm Cx3cr1 no varió significativamente. Estos resultados abren la posibilidad de que no es el número de células de microglía las que cambian en P8 de 2 m, sino más bien una regulación de la expresión del marcador Iba-1. Estos datos están siendo investigados en estos momentos.

5. Evaluación de la morfología

En la evaluación de la morfología, recurrimos al marcador específico de macrófagos/microglía Iba-1, ampliamente usado en el análisis de la morfología (Bachstetter *et al.*, 2015; Kongsui *et al.*, 2014; Streit *et al.*, 2014), debido a su capacidad de reconocer microglía quiescente y activada (Shapiro *et al.*, 2009). De todo el cerebro, se seleccionó hipocampo (CA1), una región donde habíamos observado mayores cambios entre R1 y P8 para la tinción de Iba-1, así como la presencia de depósitos de PAS y daño asociado a senescencia.

Con este propósito, las imágenes fueron tomadas a microscopio confocal con un objetivo de 40x, aplicando zoom 1,7x para los casos en que se tomaron mapas del hipocampo.

Al analizar las imágenes recurrimos, por un lado, a un criterio visual para contabilizar los cambios de morfología de forma cualitativa; por otro lado, las imágenes fueron analizadas aplicando el análisis de Sholl.

5.1. Caracterización visual manual

Uno de los problemas en la caracterización de los cambios de morfología es la búsqueda de un consenso, de qué puede ser considerado una respuesta a condiciones fisiológicas normales y qué pueden ser consideradas consecuencia del envejecimiento. En ratones R1 se observa un marcaje similar al observado para CSFR1-EGFP en el BP (Torres-Plata *et al.*, 2014), una distribución homogénea de células muy ramificadas, si solaparse los procesos entre las células. Las diferencias entre R1 y P8 son sutiles, sin observarse un patrón mayor de activación o un cambio drástico de morfología. Hay que tener en cuenta que muchos de estos criterios desarrollados para clasificar los tipos de microglía y los cambios con el envejecimiento se han desarrollado a partir de lo observado en humanos seniles o con patología (Bachstetter *et al.*, 2015; Streit *et al.*, 2014), donde los cambios en humanos son más

abruptos que en roedores.

En roedores, de los parámetros analizados para humanos, en nuestro trabajo sólo se constató que esta distribución cambia con la edad para el aumento de microglía con aspecto distrófico o deteriorado, en la línea de lo que se ha descrito para humanos con EA (Streit *et al.*, 2009) u otras condiciones neurodegenerativas (Bachstetter *et al.*, 2015), así como in vitro al tratar con amiloide (Tischer *et al.*, 2016). Ser categorizó como “distrófico”, siguiendo el criterio de Streit para humanos (Streit *et al.*, 2004; Streit *et al.*, 2014) para todas aquellas células de microglía que aparecerían formadas por cuerpos celulares fragmentados y reducido número de procesos celulares y desramificados, (Figura 27, panel A, Resultados) con frecuencia aparecen acortados y engrosados (Schilling y Eder, 2014; Streit *et al.*, 2009). Para este apartado, se incluyó el análisis a ratones C57BL/6 para comparar con el envejecimiento normal sin patología en otra cepa y descartar cambios característicos de los ratones SAM. Los resultados obtenidos (Figura 27, panel B, Resultados), mostraron que los P8 a los 14 m acumulan mucha mayor proporción de microglía con aspecto deteriorado. La misma tendencia se ve en ratones de C57BL/6 pero el porcentaje contabilizado es mucho menor a los 24 m.

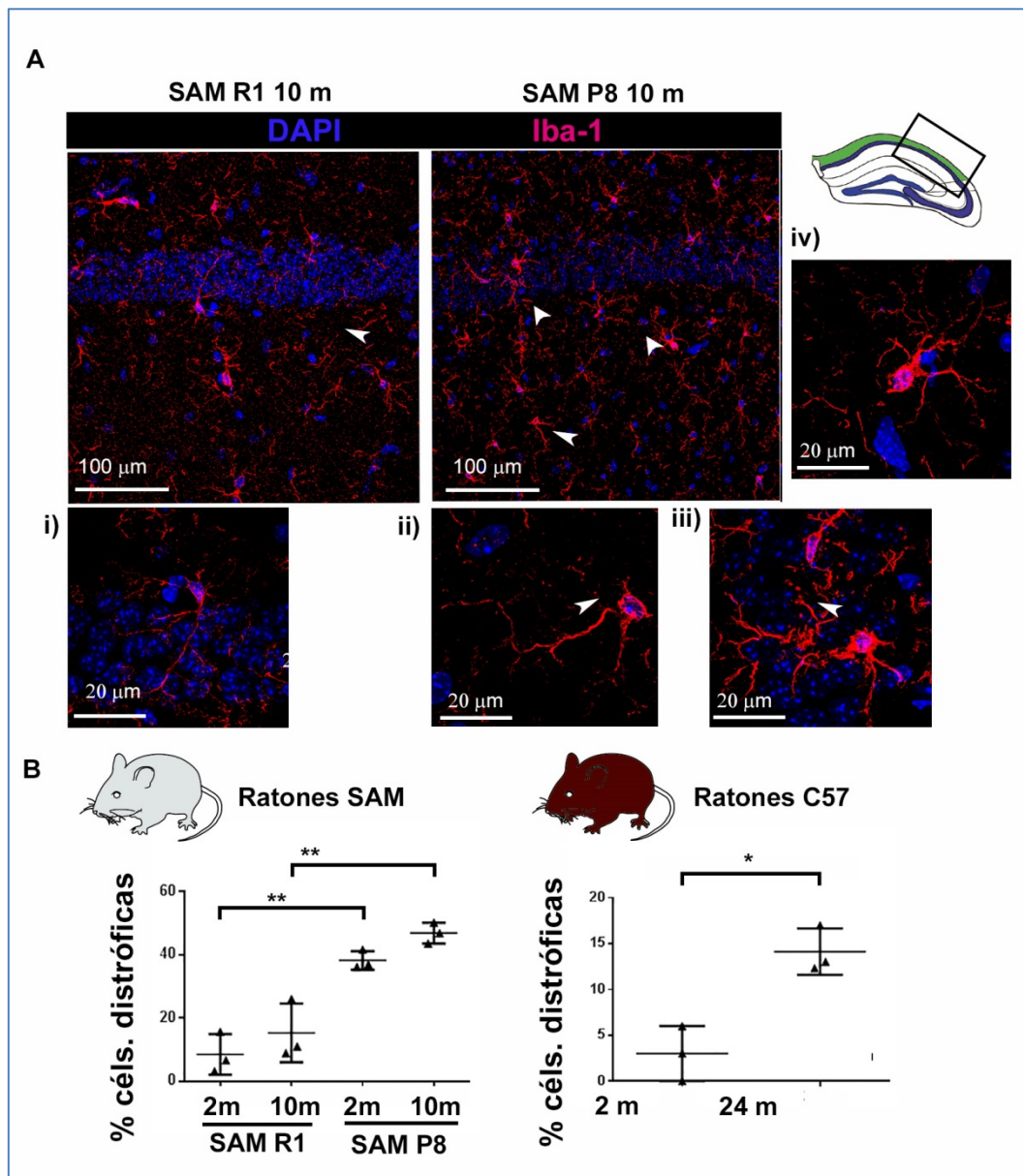


Figura 27. Resultados.- Evaluación de porcentaje de microglía distrófica. A) Capturas de imágenes representativas de SAM R1 y SAM P8 de 10 meses, mostrando en los recuadro detalles marcados con una flecha e indicando la presencia de microglía con aspecto normal (i) y distrófica (ii-iv). B) Porcentaje de microglía con aspecto distrófica en ratones SAM de 14m y C57BL/6 de 24m. Esta microglía de morfología irregular (ii-iv) presenta anomalías citoplasmáticas tales como procesos desramificados, fragmentados o tortuosos, así como bultos esferoides protuberantes. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 TCS a partir de secciones de criostato de 30 μ m de grosor. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul); la microglía/macrófagos de cerebro está teñida con Iba-1 (rojo). Las barras de escala están incluidas en las imágenes.

5.2. Análisis de Sholl

Para nuestro caso, se aplicó el análisis del Sholl (Sholl, 1953), sobre las células de hipocampo y poder evaluar su patrón de ramificación, adaptado para imágenes bidimensionales (Ferreira *et al.*, 2014).

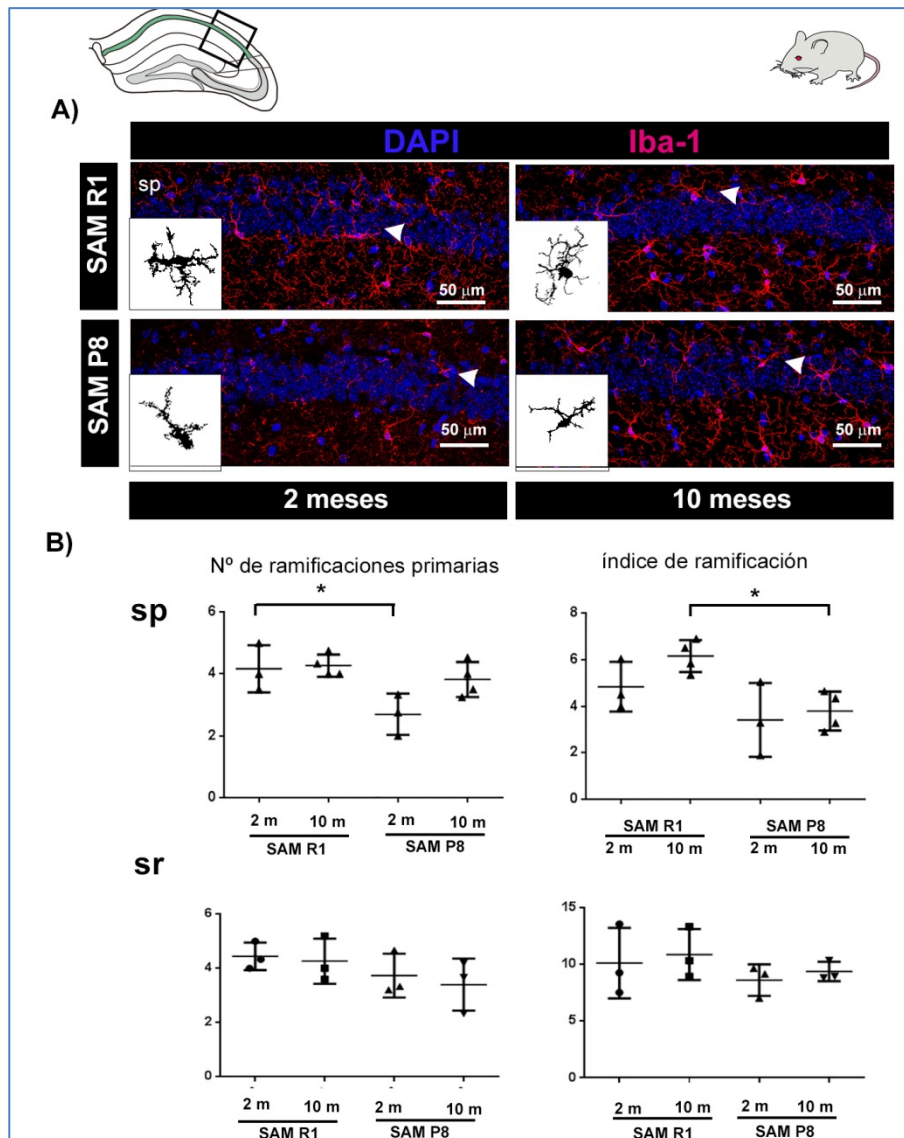


Figura 28. Resultados.- Análisis de Sholl en hipocampo. A) Capturas representativas de las regiones usadas en la evaluación de la morfología de la microglía. B) Resultado del análisis de Sholl, número de ramificaciones primarias y número medio de intersecciones en el estrato piramidal (sp) y radiado (sr) de ratones SAM de 2 y 10 meses. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal de fluorescencia invertido Leica SP5 TCS a partir de secciones de criostato de 30 μm de grosor. Los núcleos están teñidos con DAPI (azul); la microglía/macrófagos de cerebro está teñida con Iba-1. Las barras de escala están incluidas en las imágenes. Abreviaturas: sp, capa o estrato piramidal; sr, estrato radiado.

La microglía se integra dentro del tejido neuronal con una morfología de las ramificaciones distintiva y a través de las cuales escanea el ambiente que le rodea. El envejecimiento causa una reducción significativa en la capacidad de la microglía de realizar sus función normal y está marcadamente acelerado en modelos animales de EA (Baron *et al.*, 2014). Mientras estos cambios estructurales no han sido vistos en roedores de forma tan llamativa, si se ha descrito que la arborización de la microglía de ratón envejecido está significativamente reducida en tamaño y complejidad (Udeochu *et al.*, 2016).

En nuestro caso, los P8, sobre todo los de 2 meses (Figura 28, Resultados) tienen menos ramificaciones primarias que los R1 a la misma edad en regiones como sp. A los 10 meses presentó además menor índice de ramificación. El índice de ramificación (Schoenen Ramification index), tiene en cuenta la arborización de las ramificaciones de una célula, de forma que a menor sea el índice, menor ramificación (Schoenen, 1982).

Sin embargo, ninguno de estos cambios se observa en el sr, indicando que los cambios durante el envejecimiento no son homogéneos en el hipocampo y que algunas regiones son más sensibles a los cambios consecuencia del envejecimiento.

DISCUSIÓN

El trabajo experimental de esta Tesis doctoral se ha centrado en dos objetivos prioritarios que van a ser discutidos de forma independiente. Por un lado, el aislamiento y caracterización de células mieloides cerebrales en el cerebro adulto de ratón en homeostasis. Por otro lado, el estudio de los cambios en densidad, morfológicos y de marcadores de los macrófagos de parénquima en el envejecimiento normal y en el modelo de envejecimiento prematuro SAM P8.

Aislamiento y caracterización de células mieloides cerebrales en el cerebro adulto de ratón en homeostasis

Para estudiar y aislar las células mieloides cerebrales, hemos utilizado animales transgénicos como es el ratón *Csf1r-EGFP*, que expresan la proteína EGFP bajo el control del promotor de *CSF1R/CD115/fms* (Sasmono *et al.*, 2003). *CSF1R* desempeña un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la microglía cerebral (Elmore *et al.*, 2014; Erlich *et al.*, 2011), y nuestros datos muestran la existencia de células morfológicamente distintas *CSF1R-EGFP*⁺ en parénquima cerebral (BP) y membranas meníngeas y plexos coroideos (m/Ch) en los ratones *Csf1r-EGFP* (Figuras 1, 2, 3 y 4, Resultados).

La presencia de diferencias en las células *CSF1R-EGFP*⁺ dentro de las distintas áreas cerebrales está en consonancia con resultados previamente descritos que muestran células mieloides de cerebros de rata y ratón no lesionados, identificadas con un panel de diferentes anticuerpos y métodos (Bullock *et al.*, 2008; Matyszak *et al.*, 1992; McMenamin, 1999; McMenamin *et al.*, 2003; Proding *et al.*, 2011).

Usando un marcador de células de microglía cerebral como *Iba-1* hemos mostrado que, en el tejido cerebral, este marcador celular co-localiza con células *CSF1R-EGFP*⁺ en los análisis de inmunofluorescencia (Figura 5, Resultados). Estos resultados muestran que los ratones transgénicos *Csf1r-EGFP* reproducen las diferentes morfologías existentes entre las distintas células mieloides del cerebro observadas mediante el marcaje con *Iba-1*. En el cerebro propiamente dicho, podemos detectar dos células mieloides diferentes: la microglía propiamente dicha, con soma pequeño y largas prolongaciones como se describe en la literatura (ver Introducción) y células ameboides, muy próximas a los vasos, que podrían corresponder a macrófagos perivascuales (Proding *et al.*, 2011). Nuestros datos, mostrados en la Figura 4 (Resultados), indican que son realmente macrófagos perivascuales y que estos, por lo tanto, tienen expresión del marcador *CD115/CSF1R*. Sin embargo, cuando hemos aislado las células de esta localización (BP, Figura 8, Resultados), la mayoría de las células *CSF1R-EGFP*⁺ aisladas de cerebro no lesionado sin las membranas m/Ch mostraron una

expresión moderada de CD45 (CD45^m), con muy pocas células que expresan CD45^h (ver Figura 7, Resultados). Este hallazgo está en concordancia con la baja frecuencia de infiltración de leucocitos periféricos en cerebro sano, que sin embargo no detecta los macrófagos perivasculares existentes en el BP, y su origen periférico (Ginhoux *et al.*, 2009).

Nuestros métodos de aislamiento se basan en los descritos por otros autores (Carson *et al.*, 1998; Ford *et al.*, 1995; Sierra *et al.*, 2007), y de acuerdo con sus datos, nuestro procedimiento de aislamiento con perfusión larga de los cerebros antes de la disección, eliminan la mayor parte de las células CD45^h de las preparaciones del cerebro. Esto no explica el por qué no vemos las células CD45^h existentes en los vasos del BP. Es posible que nuestro método de aislamiento no extraiga eficientemente estas células perivasculares y que, por lo tanto, no se evalúe el número exacto de estas células CD45^h en el análisis por citometría. Se necesitará más trabajo para aclarar el número de células CD45^h que residen en el espacio perivascular.

La mayoría de los estudios previos aislaban células del cerebro total y en nuestro caso, hemos aislado células procedentes del propio BP y células presentes en las membranas m/Ch. El estudio de estas dos localizaciones nos permite estudiar y separar los cambios existentes en aquellos compartimentos cerebrales que están en contacto directo con el exterior (m/Ch), del tejido cerebral propiamente dicho (BP).

En las células obtenidas a partir de las membranas m/Ch, $4 \pm 3\%$ de células CD45⁺ aisladas fueron CSF1R-EGFP⁻ mediante análisis por citometría de flujo. Estas células son de origen mieloide, ya que se marcaron con anticuerpo anti-CD11b. El uso de los ratones Csf1r-EGFP junto con los análisis por inmunofluorescencia, utilizando otros marcadores mieloides bien conocidos revela la complejidad de las células mieloides en el cerebro. Se observó una variación en la intensidad de tinción de CSF1R-EGFP⁺, ya que, $7 \pm 2\%$ de las células CSF1R-EGFP⁺ que hemos detectado fueron Iba-1^{low} /Iba-1⁻ en las preparaciones m/Ch. Esto sugiere, que diferentes células mieloides coexisten en el cerebro normal. Todavía no sabemos el origen exacto de estas células, o si difieren funcionalmente de las células CSF1R-EGFP⁺ Iba-1⁺. Lo que sí sabemos es que las células CSF1R-EGFP⁺ Iba-1⁻ fueron muy prominentes en la membrana meníngea, y estudios futuros serán necesarios para analizar por separado el plexo coroideo y la membrana meníngea.

Actualmente, estamos estudiando cómo estas poblaciones de células cambian en respuesta a los desafíos neuroinflamatorios. Hasta ahora, nuestros datos indican que más de un marcador mieloide específico es necesario para dar una idea clara del número y la

complejidad de las células mieloides en el cerebro, en particular en las membranas cerebrales y plexos coroideos, y que el análisis de la suspensión celular mediante distintas técnicas de citometría e inmunofluorescencias serán necesarias, junto a estudios de secuenciación masiva.

La entrada y activación de células T en el parénquima cerebral requiere una interacción preexistente de estas células presentadoras de antígeno (APC). La mayoría de las células en el cuerpo pueden presentar antígeno a células T CD8⁺ a través de moléculas MHC de clase I, y por lo tanto actúan como posibles APCs. Sin embargo, el término APC se reserva a menudo para células especializadas que pueden cebar células T CD8⁺ (citotóxicas) a través de moléculas MHC de clase I (MHC I) y también estimular células T CD4⁺ (ayudantes) a través de MHC de clase II (MHC II). Las APC que expresan moléculas del MHC II se denominan en el campo APC profesionales y consisten principalmente en macrófagos y células dendríticas (DCs). Aunque ha sido descrito la existencia de una población de células CD11c-GFP⁺ en BP en los animales transgénicos utilizados (Bulloch *et al.*, 2008), nuestros análisis de inmunofluorescencias no nos han permitido localizar células CD11c⁺ en esta localización, aunque sí se ha observado en los plexos coroideos principalmente (Figura 11, Resultados). En el presente estudio, hemos demostrado la acumulación de una población de células Flt3L dependiente que expresan el receptor DNGR-1 (CLEC9A). Estas células son células mieloides en el cerebro con el siguiente fenotipo: DNGR-1/Cle9A-EGFP⁺ CD45^h CD11b^{low} MHC II⁺. Estas células se acumulan principalmente en las membranas m/Ch que separan el cerebro del exterior. Llamamos a estas células m/Ch DCs, como se ha propuesto antes (Anandasabapathy *et al.*, 2011). Se ha demostrado que estas células comparten características funcionales y de desarrollo con CD8α⁺ cDCs (classical DCs) del bazo, y aquí mostramos que los m/Ch DCs expresan el receptor de lectina de tipo C: DNGR-1/CLEC9A.

El tratamiento con Flt3L no aumentó el número de células CSF1R-EGFP⁺ en ninguno de los aislados cerebrales: BP o m/Ch (datos no mostrados). Este hallazgo está de acuerdo con datos previos que muestran que las m/Ch DCs responden a Flt3L y expresan el receptor de Flt3L pero no el receptor CSF1R/CD115 en su superficie celular (Anandasabapathy *et al.*, 2011). Nuestros datos muestran que, mientras que el ratón Csf1r-EGFP es un buen modelo para visualizar las células de la microglía en el cerebro, hay un subconjunto de células mieloides que podríamos estar pasando por alto. Por esta razón, hemos llevado a cabo la mayor parte de nuestros análisis de las células mieloides cerebrales en células CD45⁺, distinguiendo la microglía residente en el BP como la células CD45^m y las células CD45^h, que corresponderían a células mieloides de origen periférico, es decir de la médula ósea (ver Introducción). Aunque no hemos confirmado esta observación en experimentos con quimeras de ratón, esta distinción entre las células CD45⁺ residentes y de origen periférico en el cerebro

ha sido observada por muchos estudios de microglía y macrófagos cerebrales infiltrantes periféricos (Ford *et al.*, 1995).

Estos resultados plantean la cuestión de si estas células dependientes de Flt3L son verdaderas células dendríticas. La existencia de células dendríticas parenquimatosas cerebrales en el cerebro normal sigue siendo debatida, aunque se han encontrado células con marcadores DCs en diversas localizaciones del SNC (Matyszak *et al.*, 1992; McMenamin, 1999; McMenamin *et al.*, 2003). Más recientemente, se ha descrito la presencia de células CD11c⁺ mediante el uso de ratones transgénicos, tales como el modelo de ratón CD11c-EYFP (proteína fluorescente amarilla mejorada), que se construyó para identificar células dendríticas en la periferia (Lindquist *et al.*, 2004); así como en ratones CD11c-GFP (Jung *et al.*, 2002). El análisis de estos ratones transgénicos han mostrado células CD11c-fluorescentes que residen principalmente en el m/Ch, los espacios perivasculares y el parénquima yuxtavascular, con toda la población de células CD11c-EYFP⁺ co-expresando Iba-1 y MHC II en el parénquima cerebral en estado estacionario (Anandasabapathy *et al.*, 2011; Bulloch *et al.*, 2008; Prodinger *et al.*, 2011).

Trabajos previos han demostrado la presencia de células MHC II⁺ en el m/Ch pero no en BP de ratas y ratones no lesionados por análisis de inmunofluorescencia (Matyszak y Perry, 1996), en línea con nuestros resultados. Otros estudios han descrito un aumento de estas células MHC II⁺ en condiciones neuroinflamatorias (Greter *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2011; Prodinger *et al.*, 2011). Nuestro análisis del cerebro no lesionado muestra clara expresión de células MHC II⁺ en m/Ch, y esperábamos que estas células expresasen CD11c. En su estudio, Bulloch *et al.* (2008) discuten la dificultad en la identificación de la proteína CD11c en cerebros jóvenes en estado estacionario con los anticuerpos disponibles, que resultaron ser poco fiables y dan resultados inconsistentes en análisis de microscopía confocal. Estos resultados están en línea con los informes anteriores (Fischer y Reichmann, 2001; Karman *et al.*, 2006; Matyszak y Perry, 1996; McMenamin, 1999) en los que se detectaron DC con los mismos anticuerpos. El uso de ratones transgénicos tales como CD11c-YFP y CD11c-EGFP ha sido muy útil para visualizar las células CD11c⁺ en el cerebro no herido, revisado en (Probst *et al.*, 2005; Ransohoff y Engelhardt, 2012; van Rijt *et al.*, 2005).

Nuestros análisis siguiendo protocolos de inmunofluorescencia clásicos no eran lo suficientemente sensible para detectar las células CD11c⁺ en el cerebro de ratón en homeostasis. Por lo tanto, pusimos a punto un método basado en tiramida para mejorar la tinción positiva con el anticuerpo CD11c. Esta técnica aumenta enormemente la señal positiva, y fuimos capaces de observar células CD11c⁺. Las células CD11c⁺ en el cerebro no lesionado

se estudiaron en ratones tratados con Flt3L y se encontraron principalmente en los plexos coroideos del cerebro no dañado. Sin embargo, sería de gran utilidad el uso combinado de otros marcadores moleculares tales como MHC II, los cuales podrían proporcionar una manera de detectar con mayor precisión la presencia de células mieloides con un papel potencial como APC. Las células MHC II⁺ son muy prominentes en las membranas cerebrales, principalmente en el plexo coroideo, pero muy raras en el BP de la rata (Matyszak *et al.*, 1992; McMenamin, 1999; McMenamin *et al.*, 2003). Como se muestra en el cerebro no enfermo (Figura 11 y 12, Resultados), las células MHC II⁺ están presentes principalmente en los plexos coroideos del cerebro en nuestras preparaciones cerebrales, aunque Flt3L indujo la presencia de MHC II⁺ en la membrana meníngea cerca de los vasos sanguíneos. Hemos detectado algunas pero no muchas células MHC II⁺ cerca de los vasos, muy cerca de la membrana basal (Figura 11, Resultados), pero no hemos sido capaces de detectar células CD11c⁺ en el área perivascular o yuxtavascular como se muestra en (Proding *et al.*, 2011). Una elevada autofluorescencia alrededor de los vasos más grandes en el parénquima cerebral ha hecho muy difícil visualizar las células CD11c⁺ en esta localización cerebral (datos no presentados).

Se ha establecido la relación entre las DCs CD8 α ⁺ de ratón procedentes de tejidos linfoides y DCs CD103⁺ CD11b^{low} de ratón procedentes de tejidos no linfoides (Ginhoux *et al.*, 2009). Estas células y sus homólogos humanos expresan el receptor DNNGR-1 (Poulin *et al.*, 2012). Las DCs CD8 α ⁺ periféricas han sido implicadas en el mantenimiento homeostático de la tolerancia inmune y la prevención de la enfermedad autoinmune. Además, en el bazo, las DCs CD8 α ⁺ DNNGR-1/CLEC9A⁺ comparten con otras DCs la capacidad de procesar y presentar antígenos en el contexto del MHC II, pero son más eficientes en la captación fagocitaria de células muertas (Iyoda y Inaba, 2002; Schulz y Reis e Sousa, 2002). De hecho, DNNGR-1 ha sido identificado como un receptor capaz de reconocer antígenos de muerte celular y es además, un receptor dedicado a la presentación cruzada de antígenos asociados a células muertas (Pooley *et al.*, 2001). Caracterizar el papel exacto de estas células acumuladas en el cerebro en presencia de Flt3L será un tema interesante que desarrollar en los próximos años.

Nuestros resultados apoyan una naturaleza dendrítica de estas células Flt3L-dependientes en el cerebro. En primer lugar, son sensibles a Flt3L, una citoquina que se ha demostrado que aumenta el repertorio dendrítico. En segundo lugar, expresan DNNGR-1/Clec9A, como hemos descrito con el uso de ratones Clec9a^{egfp/egfp} y la expresión de Dnng-1 ARNm. Finalmente, expresan los factores de transcripción Batf-3 e Irf-8, ambos requeridos para la maduración de DCs CD8 α ⁺ clásicas (Murphy, 2013).

Aunque la presencia de MHC II en la membrana es un requisito para la presentación de antígeno, no es suficiente para obtener una completa activación de células T. CD80 y CD86 son moléculas co-estimuladoras que tienen un papel importante para la presentación de antígenos a las células T. En presencia de Flt3L no hemos observado un aumento en los niveles de mRNA de estas moléculas en el m/Ch, a pesar del aumento Flt3-L dependiente de células MHC II⁺ (Figura 13, Resultados). Por lo tanto, nuestros datos hasta ahora no aclaran si estas células son eficientes en su papel como células presentadoras de antígeno, o si se necesitan señales adicionales para lograr fenotipo de DC madura y eficiente en este papel. Puesto que no hemos observado un aumento en las moléculas co-estimuladoras, la hipótesis es que estas células no activan eficazmente las células T, y que es necesaria una señal neuroinflamatoria adicional. Actualmente, estamos analizando qué señales son necesarias para obtener una respuesta inmune completa en estas células.

La existencia, la regulación y el papel de APCs en las DCs cerebrales tienen implicaciones para el desarrollo de estrategias para dirigir cargas a estas DCs de cerebro m/Ch usando anticuerpos específicos de receptor. La similitud de estas células con las células linfocíticas CD8α⁺DNDR-1⁺ sugiere que podrían ser responsables de producir respuestas CTL eficaces (Caminschi *et al.*, 2008), y por lo tanto podría ser un objetivo importante en trastornos cerebrales tales como enfermedades neurodegenerativas basadas en neuroinflamación, encefalitis inducida por microbios y tumores cerebrales tales como gliomas.

Estudio de los cambios en densidad, morfológicos y de marcadores de los macrófagos de parénquima en el envejecimiento normal y en el modelo de envejecimiento

1. Acúmulos de PAS asociado con la edad

El envejecimiento en ratones implica varios cambios asociados, algunos de los cuales pueden ser resultado de procesos patológicos. Uno de estos cambios es la aparición de estructuras de aspecto granular que están principalmente localizadas en el hipocampo (Manich *et al.*, 2014). Estas estructuras redondeadas/ovoides están organizadas en clústeres (Figura 17, Resultados) y una de las características principales es que son positivas con ácido peryódico de Schiff (PAS) y su acúmulo de gránulos de PAS parecen depender del envejecimiento (Manich *et al.*, 2016).

Los gránulos de PAS se acumularon preferentemente en el hipocampo de ratones SAM P8 de 10 m (Figura 18, panel B, Resultados). A diferencias de algunos autores que describen

acumulación de PAS dependiente de la cepa (Takeda, 2009), el aumento de acúmulos de PAS en ratones R1 es mucho menor y se comportan como los ratones C57Bl/6 de 13 m de las mismas edades (dato no mostrado); se pueden detectar presencia de algunos gránulos aislados en los R1 de 10 m pero en mucha menor proporción que en ratones envejecidos P8 o en el modelo animal de EA APP-PS1. A los 10 meses, coincide con la aparición de los déficits de memoria y aprendizaje llamativos en SAM P8, junto a otras características similares a las observadas en la EA (Miyamoto *et al.*, 1986).

Los acúmulos de PAS en P8 y APP-PS1 (como control) sólo se detectan en la formación hipocampal, coincidiendo con las regiones donde se observa la aparición de las placas amiloides. Las regiones afectadas fueron estrato lagunoso-molecular (slm), estrato radiado (sr), capa de células piramidales (sp) y estrato *oriens* (so) de CA1 y CA3 y del hipocampo (Figura 18, panel A, Resultados), preferentemente en hipocampo dorsal. Estas estructuras siguen un patrón similar al descrito en modelos animales de ratones C57BL/6 transgénicos, donde ha sido descrita la presencia de placas y donde se observan los primeros cambios en el envejecimiento normal y patológico (LaFerla y Green, 2012).

Aunque sea discutible como marcador específico de depósitos amiloides (Manich *et al.*, 2016), dada la presencia de acúmulos de PAS en regiones afectadas por los cambios del envejecimiento (normal y de senescencia acelerada) observadas en este estudio, y junto a los hallazgos aportados en otros estudios (Akiyama *et al.*, 1986; Jucker y Ingram, 1994), parecen ser un marcador válido para detectar regiones afectadas por procesos neurodegenerativos, independientemente de cuál sea la naturaleza o mecanismo exacto del por qué se originan.

2. Cambios en la densidad de microglía asociado con la edad

En esta tesis hemos descrito el aumento de densidad de microglía con la edad (Figura 19, Resultados), tanto en la cepa susceptible a envejecimiento (SAM P8), como en la cepa control (SAM R1) al comparar edades muy avanzadas (14 meses), por encima del tiempo medio de vida (12 m) para los ratones SAM P8 (Hosokawa *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 2005). A los 10 m, se detectó un aumento del número de células Iba-1⁺ en el giro dentado de la cepa R1 (Figura 20, panel C, Resultados); sin embargo, no llegó a ser significativa en las evaluaciones de hipocampo total (Figura 20, panel A, Resultados).

En varios estudios, usando Iba-1 en técnicas de *immunoblotting*, se constata el aumento de Iba-1 en *cornu ammonis* 1 y 3 (CA1 y CA3) de ratas envejecidas (VanGuilder *et al.*, 2011) del mismo modo, se llega a idénticas conclusiones con homogenizados de tejido de ratón C57BL/6 envejecido (Sandhir *et al.*, 2008). Sin embargo, estos estudios no pueden aclarar si ese aumento se debe a una mayor expresión de proteína con la edad o por un aumento en el número de células con el envejecimiento.

La mayoría de los estudios defienden la existencia de una mayor densidad celular con la edad en varios compartimentos del SNC y usando varios marcadores de microglía diferentes (Conde y Striet, 2006; Huang *et al.*, 2009). Sin embargo, existen algunas discrepancias en resultados. Para Iba-1, por ejemplo, hay estudios que indican la no existencia de cambios en hipocampo de ratones envejecidos de 12 m (Albayram *et al.*, 2011) con fondo genético C57BL/6 y un tiempo de vida superior a los P8 y R1. El hecho de que ratones C57BL/6 no pueden considerarse como envejecidos, puede influir en la no aparición de diferencias significativas. Otro estudio posterior en ratas envejecidas, la población de microglía llega a disminuir de forma significativa (Cerbai *et al.*, 2012). Evaluando otras regiones del cerebro (estriado, globo pálido y *sustancia nigra*) en ratones envejecidos de 27 m (Walker *et al.*, 2016), sí describen un aumento significativo con la edad. En corteza visual en ratones de 3 y 24 m, también se registra el mismo aumento (Tremblay *et al.*, 2012). Estas discrepancias en la bibliografía podrían ser debidas a la presencia de diferentes animales y cepas, marcadores de microglía, el método de estereología usado y/o la elección de la estructura cerebral examinada.

En ratones SAM, se describen un aumento en la tinción CD45 positiva con la edad en hipocampo (especialmente en la parte medial del CA1) de SAM P8 y SAMP 10; no ocurre lo mismo en SAM R1 con la edad (Kawamata *et al.*, 1998). Nuestro trabajo es, en el momento de nuestro conocimiento actual, el primero en evaluar la densidad de microglía en SAM P8, mediante técnicas de estereología.

Nuestros datos indican que los SAM P8 tienen menor densidad de microglía Iba-1⁺ que los ratones control a los 2 m. El aumento de microglía es similar en R1 y P8 con la edad, comparando ratones envejecidos (14 m) de cada cepa con los ratones jóvenes (2 m) respectivamente (Figura 19, Resultados). Este aumento no llega a igualar nunca el número de células Iba-1⁺ en los ratones R1 de 10 meses (Figura 20, Resultados). Estos datos indican que la expresión de Iba-1 en los ratones P8 no parece comportarse como en el animal control R1, y su significado está siendo evaluado en estos momentos. Estas regiones, salvo s. rad., coinciden con las regiones que parecieron verse más sensibles al envejecimiento en SAM P8.

Además, este aumento parece afectar al número de células de microglía de forma significativa, inferior en el caso de los ratones SAM P8 en las mismas franjas de edad. En nuestro trabajo, los acúmulos de gránulos de PAS sólo se registraron en los SAM P8 a los 10 m y no antes (Figura 18, Resultados), por lo que podemos concluir que los cambios en la densidad de la microglía acontecen mucho antes que el acúmulo de estos depósitos.

A los 2 m, los ratones P8 experimentan algunos cambios estructurales diferenciales, mucho antes de que se desarrollen los primeros síntomas de deterioro cognitivo manifiesto, reportados en la bibliografía (Amano *et al.*, 1995) y en un periodo en los que se observan los primeros cambios asociado al envejecimiento (Diaz-Moreno *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 1986). Por ejemplo, los ratones SAM P8 comparados con los R1, la adquisición de respuesta pasiva de evitación, que mide conducta ansiosa, es ligera pero está significativamente alterada a los 2 m y aumenta de forma llamativa con la edad. Lo mismo ocurre en pruebas que evalúan aprendizaje y memoria espacial (como la piscina de Morris y el tiempo de ejecución para alcanzar la meta) (Miyamoto *et al.*, 1986). Todo parece indicar que las primeras alteraciones de la conducta se inician a los 2 m pero son llamativos y abruptos a edades mayores. Varios autores toman como edad media de aparición de los síntomas característicos de la EA en los P8 en torno a los 6 m (revisado en (Pallas *et al.*, 2008), y los déficits de memoria y aprendizaje llamativos en SAM P8 suceden entre los 8 y los 10 m, junto a otras características similares a las observadas en la EA (Miyamoto *et al.*, 1986).

En los SAM P8 analizados en este trabajo, algunas regiones de CA1 parecen especialmente afectadas, como la capa de células piramidales o el estrato *oriens*. La existencia de pérdida neuronal en el envejecimiento fisiológico en el hipocampo (especialmente, la capa de neuronas piramidales) es controvertida, aunque sí está aceptada la pérdida neuronal en procesos patológicos tanto en humanos, como en modelos animales (Hof *et al.*, 1996; Rapp y Gallagher, 1996).

Nuestros resultados van en la dirección de la existencia de un ligero aumento de células Iba-1⁺ asociada al envejecimiento. El significado de este aumento no está del todo claro; una hipótesis aboga por un papel compensatorio (Streit y Xue, 2010), apoyado por varios estudios, sugieren que la capacidad proliferativa de la microglía no se pierde con la edad y de hecho, se puede ver aumentada bajo ciertas condiciones en comparación con cerebros jóvenes (Ajami *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009), con el objetivo de mantener el nivel necesario de protección a medida que declina la capacidad funcional con la edad. En caso de procesos neurodegenerativos tipo EA, la acumulación de microglía alrededor de las placas, junto con la

sobreexpresión de varios marcadores, ha sido tomada como evidencia de que la proliferación de la microglía incluso aumenta con la edad. Esto es apoyado por varios estudios *in vivo*, usando marcadores de proliferación en ratones transgénicos (Baron *et al.*, 2014). Se necesitan estudios adicionales para validar el potencial proliferativo de la microglía en EA, así como definir las consecuencias de esta expansión pero presumiblemente, la proliferación alrededor de las placas podría servir como una línea de defensa para limitar los depósitos amiloides. Por tanto, como podría estar ocurriendo en los SAM P8, si estos *pools* de microglía se agotan o no funciona bien (evidenciado por presentar el menor marcaje de células Iba-1⁺ en hipocampo en los SAM P8 de nuestro estudio), unido a la baja tasa de renovación de la propia microglía (Ajami *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 1992), entonces la expansión de las células senescentes disfuncionales no parece ofrecer mucha protección y se resiente el tejido, tal como se comprueba en modelos (Theriault y Rivest, 2016), provocando que estas regiones se vean más expuestas a los cambios del envejecimiento natural y repercuta en procesos patológicos propios del envejecimiento.

Otra postura sostiene que el daño cerebral sea consecuencia de una historia acumulativa de estímulos inflamatorios ambientales, que hayan desencadenado episodios de proliferación de microglía puntual y que no fueron totalmente resueltos a nivel basal (Ajami *et al.*, 2007). Esta hipótesis de trabajo parece explicar mejor los cambios observados en nuestro trabajo, dado que este aumento observado parece guardar mayor relación con el envejecimiento normal y no con el fenotipo neurodegenerativo asociado a la cepa P8. Nuestros datos indican que el aumento de células Iba-1⁺, comparando a edades avanzadas, parecen seguir la misma progresión en R1 como en P8, sin diferencias significativas en el *fold change*.

El cómo la microglía se mantiene en el cerebro adulto tanto tiempo es una cuestión todavía pendiente. Por otro lado, aunque la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) puede aumentar con la edad en condiciones como EA y en modelos de senescencia acelerada, no hay datos concluyentes que demuestren que estos cambios en sí mismo se deban a un aumento de la infiltración de macrófagos precursores periféricos (Del Valle *et al.*, 2009).

3. Acúmulos de clústeres de células hipertróficas en ratones P8

En los ratones SAM P8 a los 2 m, en nuestro estudio, se mostró una mayor proporción de clústeres de microglía que aumentaron con la edad en regiones basales y caudales del cerebro. A pesar del aumento llamativo en la intensidad de Iba-1 (Figura 21Aii, Resultados),

que algunos autores reconocen como un signo de microglía activada (Kozlowski y Weimer, 2012) o *primed* (Norden y Godbout, 2013), no se observa marcaje con MHC II en estas agrupaciones de células. La presencia de microglía activada formando clústeres se ha descrito en humanos en condiciones neurodegenerativas relacionadas con una activación de la respuesta inmune innata (van Horssen *et al.*, 2012) y alrededor de las placas de A β y en SAM P10, P8 y R1 se ha descrito la proliferación de microglía hipertrófica, marcada con F4/80 con la edad, sin diferencias significativas entre cepas (Amano *et al.*, 1995).

De todas las regiones con presencia de clústeres de microglía, se seleccionaron 3 de las regiones por su relevancia en el envejecimiento (Figura 21, panel A, Resultados).

En la formación reticular, sólo se registró un aumento significativo de acúmulos de microglía hipertrófica con la edad en SAM P8. A los 10 m, el aumento de acúmulos en P8 llega a ser significativamente mayor a los R1. La anatomía funcional de la formación reticular (Figura 21, paneles B y C, Resultados) abarca una constelación de regiones cerebrales conectadas recíprocamente entre ellas, e implica una gran variedad de funciones. En los ratones SAM P8 se registran múltiples cambios asociados al envejecimiento relacionados con estas estructuras, (Karasawa *et al.*, 1997; Karasawa *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2008; Miyamoto, 1997; Takeda, 2009), así como alteraciones de comportamiento y de aprendizaje, relacionados con la disfunción de estas estructuras y a condiciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Gambardella *et al.*, 2017; Schwartz y Roth, 2008). Estas alteraciones pueden provocar el aumento de microglía activada formando clústeres sobre los R1.

En la sustancia *nigra*, se llega a idénticas conclusiones. A pesar de no darse un aumento significativo con la edad, se registra, a los 2 y 10 m, un mayor acúmulo de clústeres de microglía. La sustancia *nigra* es una región alterada en SAM P8 (pérdida de neuronas dopaminérgicas, menor recambio de dopamina) (Karasawa *et al.*, 1997; J. Liu *et al.*, 2010).

En cuanto al hipocampo de nuestros ratones, sólo se detectaron cambios apreciables en el aumento de clústeres de microglía en el estrato *oriens* y estos cambios sólo resultaron significativos a los 2 m, registrándose un mayor acúmulo de clústeres en los P8. Además, a diferencia de las anteriores regiones, este aumento de clústeres parece seguir un patrón que recuerda a los descritos por (Streit *et al.*, 2009) en sujetos humanos: la presencia de microglía envejecida junto con microglía de aspecto distrófico, sin co-localizar siempre microglía activada y zonas de lesión. A pesar de que muchos trabajos sugieren que la inflamación crónica causada por microglía activada contribuye o es clave en los procesos neurodegenerativos, en

muchas condiciones neurodegenerativas parecen tener un papel más secundario, tal como evidencia los ensayos negativos derivados del tratamiento de antiinflamatorios para prevenir o revertir los efectos en pacientes con la EA (Kawas y Corrada, 2006).

En varios estudios (Olah *et al.*, 2011; Schilling y Eder, 2014; Bachstetter *et al.*, 2015) se detecta un aumento de la heterogeneidad con la edad, donde se observan células con un patrón ramificado y una gran proporción de células de microglía de animales envejecidos con una morfología distrófica (Schilling y Eder, 2014). En nuestro estudio (Figura 27, Resultados), se pudo ver que la microglía de apariencia distrófica también es habitual en animales envejecidos y de SAM P8. En SAM P8 se registró mayor porcentaje de células con aspecto distrófico, sin hallarse otros cambios de morfología llamativos, ni hipertrofiada ni de aspecto ameboide. En sp se detectó que el número de ramificaciones primarias o el índice de ramificación eran significativamente menores al mostrado por ratones R1. Sin embargo, otras regiones del hipocampo no mostraron cambios.

Por último, esta acumulación de clústeres de microglía puede ser debida a que la eliminación de restos celulares sea defectiva. Por ejemplo, la microglía de ratas envejecidas mostró una eliminación más lenta de células fagocíticas después de una lesión desmielinizante inducida por toxina (Zhang, 2006) Siendo la microglía los fagocitos del cerebro, no está claro qué mecanismo hay subyacente, si es que lo hay, en la limpieza de la propia microglía como plantean algunos autores (Lopez-Otin *et al.*, 2013) o si este aumento es fruto de una defectuosa eliminación de las células muertas. Tanto en la bibliografía como en nuestro caso, con la cepa SAM, las alteraciones y cambios como consecuencia de procesos neurodegenerativos transcurren de forma muy regionalizada espacialmente y es dependiente de la edad, con regiones afectadas concretas y siguiendo patrones diferentes. Las causas parecen desconocidas. En un análisis de todo el genoma de la microglía de varias regiones discretas, a lo largo de la vida adulta del cerebro del ratón, se encontró que la microglía tenía diferentes identidades transcripcionales, que envejecen de una manera regionalmente variable. En el cerebro del ratón joven, las diferencias en las vías bioenergéticas e inmunoregulatoras es la principal explicación para justificar la heterogeneidad y se sugiere que la microglía de cerebelo e hipocampo coexiste de una forma más inmuno-vigilante (Grabert *et al.*, 2016).

Estudiando en profundidad el inmunofenotipo según la región y en qué determinadas condiciones, o cómo se comporta, puede ser clave para entender el estado de la microglía en el envejecimiento. La aparente diversidad puede revelar funciones específicas, pero también

ser consecuencia del ambiente regional que le haga más sensible a las alteraciones de la microglía y que estén más vinculados a procesos neurodegenerativos.

4. Senescencia asociada a envejecimiento

Algunos autores (Streit *et al.*, 2014) han propuesto que la neurodegeneración puede ser causada por un mal funcionamiento de la microglía. Esta teoría explica el envejecimiento basándose en la senescencia asociada a replicación o a la capacidad finita de las células de iniciar ciclos de replicación, que pueden culminar en el acortamiento de telómeros y la consecución de la senescencia replicativa (Olovnikov, 1996). Se ha observado que la longitud de los telómeros en la microglía experimenta una progresiva disminución de los telómeros *in vitro* (Flanary y Streit, 2004) como *in vivo*, con cerebros envejecidos (Flanary *et al.*, 2007). En este trabajo no se han evaluado estos parámetros pero se recurrieron a dos de los marcadores más comúnmente usados para medir senescencia.

5. No co-localización de x-gal y microglía

Nuestros resultados sobre la medida de actividad galactosidasa asociada a senescencia en la microglía de los ratones SAM P8 han resultado negativos. Se observa un aumento con la edad en el marcaje de x-gal asociado a senescencia (Figura 22, Resultados), en línea con lo observado por otros autores (Geng *et al.*, 2010), pero sin embargo, no hay co-localización de células de microglía (Figura 23, Resultados). Este resultado negativo puede deberse a que la actividad galactosidasa asociada a senescencia (SA- β G) se ha aplicado para medir la senescencia replicativa (Cahu y Sola, 2013; Debacq-Chainiaux, 2008), por mecanismos que detienen la capacidad proliferativa de las células mitóticamente competentes para prevenir su transformación en tumores, más propia de células con una alta tasa de replicación, como líneas celulares tumorales (Streit *et al.*, 2009; Streit *et al.*, 2004). Sin embargo, dada la baja tasa de proliferación basal de la microglía (Ajami *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 1992), este tipo de mecanismo puede que no se esté dando.

6. Co-localización de γ H2A en microglía

También hemos analizado la presencia de γ H2AX, como un indicador de daño celular más específico y asociado con el estrés oxidativo, ambos fenómenos presentes en la cepa SAM P8 con la edad (Yang y Hu, 2005; Morley *et al.*, 2012; Baltanás *et al.*, 2013). En este trabajo, se han detectado diferencias entre las regiones basales del cerebro, donde los

acúmulos de microglía permanecían alrededor de células que mostraban daño, pero sin co-localizar en ningún momento con γ H2AX. La mayor presencia de estrés oxidativo constatada con la edad (Bettio *et al.*, 2017) y en SAM P8 como modelo de envejecimiento acelerado, parece corresponder con un ambiente de mayor estrés oxidativo en SAMP8.

Por el contrario, en el hipocampo sí se detectaron algunas células de microglía positivas para γ H2AX (Figura 24, Resultados), sin que haya un aumento llamativo en la proporción de células dañadas con respecto a las regiones basales. Dentro del hipocampo, CA1 se muestra más sensible al daño oxidativo (Wang *et al.*, 2010) y parece justificar la mayor presencia de microglía γ H2AX⁺ que en otras regiones del hipocampo, menos sensible a los daños del estrés oxidativo.

Asumiendo que la teoría de los radicales libres en el envejecimiento es correcta y el daño por radicales libres ocurre de forma inevitable en organismos aeróbicos, llevaría en última instancia al desarrollo de la mayoría de las enfermedades asociadas a edad. La demostración reciente de Raj *et al.*, en el que el daño del DNA en un modelo animal de estrés genotóxico causa una leve activación de la microglía, ofrece claro apoyo a la idea de que el daño por radicales libres, el cual a veces produce daño en el DNA y provoca neuroinflamación leve. (Streit *et al.*, 2014)

Sin embargo, este punto de vista no tiene en cuenta que el principal propósito de la senescencia es el de prevenir la propagación de células dañadas (Streit *et al.*, 2004) y desencadenar su eliminación por el sistema inmune. Por tanto, es posible que la senescencia sea una respuesta compensatoria beneficiosa, que contribuye a liberar los tejidos de células dañadas o potencialmente oncogénicas. Este punto de control de las células, sin embargo, requiere de un eficiente sistema de eliminación celular, que implica la retirada de las células senescentes y la movilización de progenitores para reestablecer el número de células. En organismos envejecidos, este sistema de recambio puede volverse ineficiente o agotarse la capacidad regenerativa de células progenitoras, ocasionando la acumulación de células senescentes que puede agravar el daño y contribuir al envejecimiento (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

7. Aumento de Iba-1-MHC II⁺ en plexos coroideos con la edad.

Los cambios relacionados con la edad en el fenotipo y propiedades funcionales de la microglía han sido descritos anteriormente (ver Introducción (Conde y Streit, 2006; Harry, 2013; Hart *et al.*, 2012; Wong, 2013)). En general, tanto en humanos como roedores, en el adulto

sano, se habla de un fenotipo en el que hay una disminución de marcadores de activación de microglía (downregulated) (Perry y Teeling, 2013). Para la expresión de MHC II en concreto, no hay expresión constitutiva en células de parénquima (Aloisi *et al.*, 2000), o por lo menos son indetectables mediante métodos de inmunohistoquímica (Bechmann *et al.*, 2007; Olah *et al.*, 2011).

Nuestro trabajo apoya la existencia de un aumento claro en la expresión de MHC II con la edad en consonancia con los resultados de (Frank *et al.*, 2007; Perry y Teeling, 2013) y en ratones SAM (Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011). En la corteza cerebral, usando OX6, que reconoce antígenos de MHC II, los SAM P8 mostraron un mayor marcaje a los 5 m (Sureda *et al.*, 2006), datos que, según los autores, indicaban un aumento de la microgliosis en cerebro de SAM P8 a edad temprana. Nuestros datos indican la existencia de un aumento de células Iba-1⁺MHC II⁺ en los ratones envejecidos (Figura 25, panel A, Resultados), en línea con lo datos que han sido descritos (Conde y Streit, 2006). Estos estudios no han podido ser realizados en los ratones R1, ya que el anticuerpo utilizado no reconoce el haplotipo de MHC II existente en esta cepa (ver Resultados).

Lo que sí podemos afirmar, es que en los SAM P8, existe un aumento significativo de células Iba-1⁺-MHC II⁺ con la edad y estuvo restringida a meninges y plexos coroideos, en semejanza a lo que ocurría en animales normales adultos (Figura 11, Resultados). Aunque existen trabajos en los que se han observado células MHC II⁺ en parénquima cerebral de animales envejecidos (Cerbai *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2009), en estos animales se utilizaban distintos marcadores y técnicas y además, no evaluaban la posibilidad de que estas células de parénquima fueran en realidad macrófagos perivasculares. El consenso general es que no hay estudios bien controlados que demuestren la presencia de células de microglía MHC II⁺ en BP de animales envejecidos, por lo que podemos decir que la expresión no es significativa en el envejecimiento o la técnica usada no es lo suficientemente sensible para detectar cambios con la edad.

Como se adelantó en Resultados, no se pudo evaluar SAM R1 por disponer de un haplotipo diferente que no reconocía nuestro marcador (Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011). Se tomó como referencia las cepas de ratones con un fondo genético similar: los ratones CD1-ICR. En los ratones CD1, nuevamente, las células Iba-1⁺-MHC II⁺ se expresaron sólo en plexos coroideos y meninges. No hay cambios significativos de 2 a 10 m, pero sin embargo, se observa mayor porcentaje de células Iba-1⁺ que en ratones P8 a esas edades, en analogía a lo

que ocurría con la cepa R1 al contabilizar número de microglía con la edad (Figura 19 y 20, Resultados).

El sistema inmune de ratones SAM muestra signos de senescencia prematura en varios aspectos funcionales (Hosokawa, 2004; Hosokawa *et al.*, 1987). Las células cultivadas del bazo de ratones SAM, con el haplotipo H2k mostraban una producción alterada de anticuerpos contra proteínas antigénicas, indicando que las cepas SAM P8 presentan deficiencias a edades tempranas (2 m) (Hosokawa *et al.*, 2003; Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011). Los cambios relacionados con la edad en la función de las APC (principal tipo celular que expresa MHC II⁺), se han examinado en ratones SAM P1, observando en MLR (mix de reacción linfocitaria) en células dendríticas (DCs) de P1 envejecidos, menor actividad estimuladora que en P1 jóvenes o en controles BALB/c envejecidos. Estos cambios asociados a edad en la actividad estimuladora de las APCs estaban relacionados con la reducción de marcadores de superficie como los MHC II en APCs (DCs y células B), las cuales son esenciales para la interacción y co-estimulación de células Th (Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011). A pesar de verse discrepancia entre deficiencia de Th2 sólo *in vitro* y de Th1 sólo *in vivo*, ambos sugieren que los ratones SAM P son defectivas en montar una apropiada repuesta inmune a un estímulo inflamatorio a nivel periférico (Shimada y Hasegawa-Ishii, 2011). En otro estudio (Abe *et al.*, 1994), los análisis de citometría de flujo también revelaron que el tamaño de la fracción de células T, especialmente las CD4⁺T fue menor en SAM P8 envejecido que en SAM R1, pese a que el tamaño de la fracción de linfocitos en bazo fue comparable entre P8 y R1 (Abe, 1994; Hosokawa, 2004; Hosokawa *et al.*, 1987; Nishimura *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 1989). Estos estudios nos llevan a concluir que la función de las TCD4 en SAMP8 es deficiente y quizás la respuesta de las APC se encuentra comprometida y esto podría explicar la menor proporción de MHC II en los SAM P8. No obstante se necesitarían, marcadores específicos de APC para confirmarlo.

8. Expresión de citoquinas con la edad

La inflamación crónica presenta varias características de inflamación aguda pero usualmente es de baja intensidad y persistente, resultando en una serie de repuestas que conducen a la degeneración del tejido. Hay varios posibles mecanismos de inflamación crónica: (1) producción persistente de moléculas reactivas por infiltración de leucocitos diseñado para eliminar patógenos (2) las células no inmunes dañadas y las células activadas inmunes llevan a la producción de citoquinas que amplifican o modulan la repuesta inflamatoria y altera los

fenotipos de las células de alrededor, a veces con el detrimento de la función de los tejidos normales (3) la interferencia con la “señalización anabólica”.

Varios tejidos, incluyendo al cerebro, muestran un desequilibrio entre los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias, probablemente en un estado crónicamente inflamado, aunque sin signos de infección (Droge y Schipper, 2007; Vijg y Campisi, 2008). En general, la microglía de ratones envejecidos se muestra resistente al cambio a fenotipo M2 en presencia de IL-4 (Fenn *et al.*, 2012). Un fenotipo resistente a pasar a M2 en un modelo de la EA como los APP-PS1, provocó la acumulación de oligómeros A β y la consecuente pérdida neural (Jimenez *et al.*, 2008). La microglía también parece ser refractaria a señales de desactivación como Cx3cl-1 y TGF β (Norden y Godbout, 2013). Por tanto, parece consecuente pensar que la activación desmesurada de las células mieloides está más relacionada con una repuesta maladaptativa que protectora.

Muchos de los estudios previos se basan en análisis de expresión de citoquinas en muestras de tejido cerebral. Dado que la microglía no es el único tipo celular que interviene en la repuesta inflamatoria (Liu *et al.*, 2015), la ventaja de nuestro estudio sobre otros realizados en SAM P8 (Tha *et al.*, 2000) es que se pudo purificar microglía adulta para ver de forma más específica el perfil de expresión y poder confirmar si la microglía en los ratones SAM P8 está en un estado reactivo o *primed*. Además se pudo comparar con la expresión de plexos coroideos y membranas por separado. Muchas veces se describe a la microglía del cerebro envejecido como una población de microglía reactiva, evidenciado por un aumento de marcadores de inflamación cuando se activa por un estímulo inmune (como LPS). Sin embargo, otros describieron a la microglía del cerebro envejecido como senescente o distrófico. La terminología depende del contexto en el cual la microglía sea examinada y está claro que la microglía de roedores envejecidos también tienen otros impedimentos funcionales (Norden *et al.*, 2013).

Centrándonos en nuestros datos con SAM P8 (Figura 26, panel A, Resultados), en el parénquima cerebral a los 2 m, la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y CCL-2 fue mayor en ratones P8 que en ratones R1. IL-6 parece afectar especialmente a las habilidades cognitivas, particularmente en memoria y funciones ejecutivas (Schram *et al.*, 2007). Este mal desempeño cognitivo inducido por neuroinflamación puede promover depresiones en edades avanzadas y marcadores de inflamación como IL-6 está también asociado con depresión en el anciano (Stewart *et al.*, 2009). Los ratones SAM P8 en algunos estudios de conducta mimetizan muchos de los cambios observados en humanos (Miyamoto *et al.*, 1992).

Al evaluar estos mismos ratones a los 10 m, CCL-2 se mantenía elevado y Tnf- α e IL-1 β aumentaron significativamente en ratones P8 sobre los ratones R1. Las quimioquinas como las proteínas quimio-atrayentes de monocitos (MCP-1 o CCL-2), son importantes mediadores de la migración de leucocitos y están aumentados en glía activada (Aloisi *et al.*, 2000) y durante el envejecimiento en el cerebro (Kumagai *et al.*, 2007).

La expresión aumentada de IL-1 β en el hipocampo, que vemos incrementada en los P8, afecta a la memoria contextual y espacial en ratones (Hein *et al.*, 2010), así como la potenciación a largo plazo (Murray y Lynch, 1998). Además, se ha demostrado su papel mediador en la disfunción cognitiva inducida por lipopolisacárido (LPS) y estrés crónico. Los ratones transgénicos a los que les falta la expresión de caspasa-1 (implicada en el preprocesamiento de IL-1 β), no sufren la pérdida de memoria contextual con el envejecimiento (Gemma *et al.*, 2005). Esto parece coincidir con los cambios sucedidos en nuestros ratones SAM P8 y nos lleva a la conclusión de que este aumento significativo a los 10 m puede explicar parte del deterioro cognitivo asociado a edad.

TNF- α es una citoquina que en humanos envejecidos se encuentra elevada en plasma y está asociado con demencia (Bruunsgaard *et al.*, 1999). TNF- α parece tener un papel clave para transferir la señal de inflamación periférica al cerebro (Qin *et al.*, 2007) y actúa de una forma autocrina/paracrina que activa la expresión de los TLR2 en microglía (Syed *et al.*, 2007) y tiene un rol esencial en la iniciación y amplificación de la cascada inflamatoria (regulación de la liberación de quimioquinas y citoquinas), estrés oxidativo, reclutamiento de células inmunes y moléculas de adhesión, apoptosis y mecanismos de reparación específico de tejido (Terrando *et al.*, 2010).

Usando marcadores de microglía de nuestras muestras para contabilizar la población celular, la expresión del marcador Cx3cr-1 e Iba-1 no aumenta con la edad (2-10 m), tal como se observó en los contajes de microglía Iba-1⁺ en hipocampo total de los 2-10 m (Figura 20, Resultados). Sólo se vio una expresión significativamente mayor de Iba-1 a los 2 m en ratones R1 sobre P8. Sin embargo, al comparar animales R1 y P8 con el marcador Cx3cr-1, específico de microglía (Harrison *et al.*, 1998), no hay diferencia en los niveles de expresión de Cx3cr-1. No sabemos a qué se debe esta disminución de la expresión de Iba-1 en P8 sobre los R1 a los 2 m, pero presumiblemente sea debido a que no toda la microglía en P8 expresan Iba-1⁺ como para ser detectada. Tomando ambos datos en conjunto, esta discrepancia probablemente pueda explicarse del siguiente modo: el número de microglía no parece cambiar de forma significativa entre cepas, ni con la edad al mantener el mismo nivel de expresión de CX3CR1;

Iba-1 reconoce células en estado quiescente y activadas, y aumenta de intensidad con la activación ante un daño o con el envejecimiento; sin embargo, en los ratones P8 hay menor expresión de este marcador. Por lo tanto, sería interesante evaluar en el futuro, si la expresión de Iba-1 es un buen marcador del estado inflamatorio de la microglía. (14 m en Figura 19, Resultados).

En la bibliografía, no se observan cambios de nivel de expresión de Cx3cr-1 en cerebro con la edad en ratones sin patología (Wynne *et al.*, 2010). Sin embargo, sí se observa que aumenta en presencia de estímulos como LPS y que esta resulta mucho mayor en jóvenes que en envejecidos, demostrando un fenotipo *downregulated*. Hay también evidencia de que en modelos animales, mimetizando aspectos de enfermedades neurodegenerativas humanas, la neuropatología puede agravarse por la delección de Cx3cr-1 (Masocha, 2009), demostrando su papel protector en cuanto la función se encuentra disminuida.

La microglía de parénquima de ratones SAM P8, a tenor de la elevada producción de citoquinas en ausencia de estímulos inflamatorios (Figura 26, Resultados), adquiere con la edad un fenotipo descrito en la bibliografía como *primed*, característico de humanos y animales envejecidos (Norden y Godbout, 2013). En el futuro, sería interesante evaluar, cómo sería la respuesta de la microglía ante un daño o infección y cómo respondería a estos cambios. Probablemente, el escenario más plausible es la existencia, en el envejecimiento, de un círculo vicioso en que restos celulares o desechos liberados del daño celular (producto del envejecimiento normal o condiciones patológicas que puedan generar respuesta inflamatoria), puedan llegar a mimetizar productos bacterianos y funcionar como un “daño endógeno” asociado a DAMPS que activan la inmunidad innata. Como el daño puede ser acumulativo a lo largo de la edad, la repuesta de peligro se vuelve crónica y por tanto, maladaptativa.

En cuanto a la expresión de plexos coroideos y meninges diseccionados de cerebro (m/Ch), evaluando la expresión de citoquinas proinflamatorias (Tnf- α , IL1- β , IL-6, Ccl-2) y marcadores de macrófagos de parénquima o microglía (Iba-1 y Cx3cr-1), no se observan diferencias significativas (Figura 26, panel B, Resultados). Esto nos lleva a concluir que la activación de la microglía en ratones SAM P8 no se encuentra directamente originada por los estímulos externos y que los cambios suceden en el propio parénquima. Estos resultados convergen con lo que se entiende como inflamación estéril dentro del cerebro. De forma similar a la inflamación inducida por microorganismos, la inflamación estéril está marcada por el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos y la producción de citoquinas inflamatorias y quimioquinas, en especial TNF- α e IL1- β (Chen y Nunez, 2010). Los estímulos estériles,

específicamente los DAMPS son reconocidos específicamente por sus receptores (ver Introducción). El prototipo de receptor específico de DAMS es el receptor de AGes (RAGe). Además de los AGes, RAGe también reconoce HMGB1 (Hori *et al.*, 1995) y los miembros de la familia S100 (Hofmann *et al.*, 1999), los cuales se liberan durante el estrés celular y con la muerte de células por necrosis, β -amiloide (Yan *et al.*, 1996), etc. La activación de los RAGE por sus ligandos desencadena una activación de varias vías de señalización, que llevan a la inducción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α (Hofmann *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001).

Como conclusión final, los resultados obtenidos en este estudio y en bibliografía en el envejecimiento normal y patológico, apoyan que la microglía con la edad adquiere un fenotipo más inflamatorio, con mayor expresión de citoquinas proinflamatorias y receptores relacionados con la inflamación en el cerebro. Esta condición de aumento basal de la inflamación con la edad es referida como microglía reactiva o sensibilizada. Un incremento modesto en el perfil inflamatorio del SNC y una función alterada de la microglía con el envejecimiento, tendría consecuencias en los cambios en el comportamiento y cognitivos asociados a la edad. Estos cambios, junto a otros ya descritos en el proceso de envejecimiento, el menor control inhibitorio colinérgico de la microglía en ancianos y por extensión, pacientes con incipientes signos de enfermedad neurodegenerativa, indican la posibilidad de un proceso neuroinflamatorio descontrolado subyacente. Nuestros datos apoyan la existencia de liberación de citoquinas que puede ser la causa del agravamiento de los déficits cognitivos. Al mismo tiempo, se observa que la microglía en algunas regiones del cerebro aumenta la proporción de microglía distrófica (Figura 27, Resultados). Desde los 2 meses se observa en hipocampo (capa de neuronas piramidales) alteraciones en la morfología de los SAM P8, con una significativa menor presencia de ramificaciones primarias (Figura 28, Resultados). Estudios más exhaustivos serán necesarios en el futuro para aclarar todas estas cuestiones abiertas.

Por tanto, en este segundo bloque podemos concluir en los SAMP8, en sujetos libres de patología, la microglía tiene un fenotipo más inflamatorio que en ratones SAMR1 y se observan cambios morfológicos propios del envejecimiento, convirtiéndolo así en un modelo para estudiar el envejecimiento normal y procesos neurodegenerativos donde la neuroinflamación juega un papel importante.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células mieloides muestran cambios morfológicos entre macrófagos de parénquima, con una estructura muy organizada y regionalizada, y el resto de las localizaciones (meninges, perivasculares y plexos coroideos), con menor ramificación y procesos cortos y engrosados.
2. La expresión de CD115/CSF1R y MHC II co-localiza en macrófagos de plexos coroideos, meninges y perivasculares, pero no en parénquima.
3. La expresión de CD115/CSF1R e Iba-1 co-localiza en parénquima y plexos coroideos pero no en las células CSF1R EGFP⁺ de las meninges.
4. El tratamiento con Flt3L preferencialmente expande una subpoblación de CD45^hCD11b^{low} de células MHC II⁺ en m/Ch y sugiere que son las bDCs previamente descritas.
5. La expresión selectiva de Dngr-1 en membranas m/Ch de animales tratados con Flt3L permite la discriminación adicional de una subpoblación de bDCs.
6. La microglía de los ratones SAM P8 y ratones envejecidos en parénquima muestran cambios morfológicos compatibles con un fenotipo senescente en el hipocampo y no co-localizan con las células MHC II⁺.
7. Los SAM P8 muestran aumento de células Iba1⁺-MHC II⁺ en plexos coroideos con la edad; sin embargo, la población de células Iba-1⁺-MHC II⁺ es menor que en ratones CD1-ICR de las mismas edades.
8. Los ratones R1 y P8 muestran un aumento del número de microglía Iba-1⁺ en hipocampo a los 14 meses.
9. Los ratones SAM P8 tienen una menor tinción de células Iba-1⁺ que los ratones SAM R1 a los 2 y 10 meses en hipocampo.
10. Los acúmulos de gránulos de PAS aumentan con la edad en ratones SAM P8.
11. Los clústeres de microglía aumentan en ratones SAM P8 a los 2 y 10 meses en regiones basales y caudales del cerebro pero no co-localizan para MHC II.
12. La microglía en los ratones SAM P8 muestran signos de daño celular en hipocampo con γ H2AX pero no en otras regiones.
13. Los SAM P8 muestran un aumento de células Iba-1⁺MHC II⁺ en plexos coroideos con la edad.
14. La microglía aislada de parénquima muestra una mayor repuesta inflamatoria en SAM P8 que en SAM R1 en condiciones basales a los 2 y 10 meses, mientras que en las membranas de plexos coroideos y meninges no se observan cambios.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41-53. doi: 10.1038/nrn1824
- Abe, Y., Yuasa, M., Fau, Kajiwara, Y., & Hosono, M. (1994). Defects of immune cells in the senescence-accelerated mouse: a model for learning and memory deficits in the aged. *Cellular Immunology*, 157(1), 59-69.
- Adachi, M., Abe, M., Sasaki, T., Kato, H., Kasahara, J., & Araki, T. (2010). Role of inducible or neuronal nitric oxide synthase in neurogenesis of the dentate gyrus in aged mice. *Metabolic Brain Disease*, 25(4), 419-424. doi: 10.1007/s11011-010-9224-8
- Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., & Sorokin, L. M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 1007-19.
- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? *Science*, 339(6116), 156-161. doi: 10.1126/science.1227901
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M., & Rossi, F. M. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature Neuroscience*, 14(9), 1142-1149. doi: 10.1038/nn.2887
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1538-1543. doi: 10.1038/nn2014
- Akiyama, H., Kameyama, M., Akiguchi, I., Sugiyama, H., Kawamata, T., Fukuyama, H.,...Takeda, T. (1986). Periodic acid-Schiff (PAS)-positive, granular structures increase in the brain of senescence accelerated mouse (SAM). *Acta Neuropathologica*, 72(2), 124-9.
- Alam, H., Sehgal, L., Kundu, S.T., Dalal, S.N., Vaidya, M.M. (2011). Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 22(21), 4068-78. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0703.
- Albayram, O., Alferink, J., Pitsch, J., Piyanova, A., Neitzert, K., Poppensieker, K.,...Bilkei-Gorzo, A. (2011). Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 108(27), 11256-61. doi: 10.1073/pnas.1016442108.
- Allen Institute for Brain Science. (consultado en 2016-2017). Brain Allen Atlas. Washington, Estados Unidos. Recuperado de: <http://developingmouse.brain-map.org>.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, 36(2), 165-79.
- Aloisi, F., Serafini, B., & Adorini, L. (2000). Glia-T cell dialogue. *Journal of Neuroimmunology*, 107(2), 111-117. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(00\)00231-9](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(00)00231-9)
- Allen, N. F., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230), 675-7. doi: 10.1038/457675a.
- Amano, T., Nakanishi, H., Oka, M., & Yamamoto, K. (1995). Increased expression of cathepsins E and D in reactive microglial cells associated with spongiform degeneration in the brain stem of senescence-accelerated mouse. *Experimental Neurology*, 136(2), 171-82.
- Anandasabapathy, N., Victora, G. D., Meredith, M., Feder, R., Dong, B., Kluger, C., . . . Liu, K. (2011). Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain. *Journal of Experimental Medicine*, 208(8), 1695-1705. doi: 10.1084/jem.20102657
- Axtell, R., & Steinman, L. (2009). Gaining entry to an uninfamed brain. *Nature Immunology*, 10(5), 453 - 455 (2009) doi:10.1038/ni0509-453
- Bachstetter, A. D., Van Eldik, L. J., Schmitt, F. A., Neltner, J. H., Ighodaro, E. T., Webster, S. J., . . . Nelson, P. T. (2015). Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 32. doi: 10.1186/s40478-015-0209-z
- Baltanás, A., Solesio, M.E., Zalba, G., Galindo, M.F., Fortuño, A., & Jordán, J. (2013). The senescence-accelerated mouse prone-8 (SAM-P8) oxidative stress is associated with upregulation of renal NADPH oxidase system. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(4), 927-35. doi: 10.1007/s13105-013-0271-6.
- Baron, R., Babcock, A. A., Nemirovsky, A., Finsen, B., & Monsonego, A. (2014). Accelerated microglial pathology is associated with A β plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 13(4), 584-595. doi: 10.1111/acel.12210
- Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60(3), 430-40. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.013.

- Barreto, G., Santos-Galindo, M., & Garcia-Segura, L. M. (2014). Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 132. doi: 10.3389/fnagi.2014.00132
- Barrientos, R.M., Frank, M.G., Watkins, L.R., & Maier, S.F. (2012). Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: implications for hippocampal-dependent cognition. *Hormones and Behavior*, 62(3), 219-27. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.010.
- Barrientos, R.M., Frank, M.G., Hein, A.M., Higgins, E.A., Watkins, L.R., Rudy, J.W., & Maier, S.F. (2009). Time course of hippocampal IL-1 beta and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(1), 46-54. doi: 10.1016/j.bbi.2008.07.002.
- Barrientos, R.M., Higgins, E.A., Biedenkapp, J.C., Sprunger, D.B., Wright-Hardesty, K.J., Watkins, L.R., ...Maier, S.F. (2006). Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiology of Aging*, 27(5), 723-32.
- Barrientos, R.M., Sprunger, D.B., Campeau, S., Watkins, L.R., Rudy, J.W., & Maier, S.F. (2004). BDNF mRNA expression in rat hippocampus following contextual learning is blocked by intrahippocampal IL-1beta administration. *Journal of Neuroimmunology*, 155(1-2), 119-26.
- Bechmann, I., Galea, I., & Perry, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunology*, 28(1), 5-11. doi: 10.1016/j.it.2006.11.007
- Bechmann, I., Kwidzinski, E., Kovac, A.D., Simbürger, E., Horvath, T., Gimsa, U.,...Nitsch, R (2001). Turnover of rat brain perivascular cells. *Experimental Neurology*, 168(2), 242-9.
- Bechmann, I., Priller, J., Kovac, A., Böntert, M., Wehner, T., Klett, F.F.,...Nitsch, R. (2001). Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *European Journal of Neuroscience*, 14(10), 1651-8.
- Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 79, 66-86. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.04.030.
- Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., . . . Tabrizi, S. J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1869-1877. doi: 10.1084/jem.20080178
- Blau, C.W., Cowley, T.R, O'Sullivan, J., Grehan, B., Browne, T.C., Kelly, L., ...Lynch, M.A. (2012). The age-related deficit in LTP is associated with changes in perfusion and blood-brain barrier permeability. *Neurobiology of Aging*, 33(5), 1005.e23-35. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.035.
- Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 77-98. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.004
- Bruunsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Jeune, B., Pedersen, A.N., Skinhøj, P., & Pedersen, B.K. (1999). A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 54(7), M357-64.
- Bryant, P. A., Trinder, J., & Curtis, N. (2004). Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 457-467. doi: 10.1038/nri1369
- Buchanan, J. B., Sparkman, N. L., Chen, J., & Johnson, R. W. (2008). Cognitive and neuroinflammatory consequences of mild repeated stress are exacerbated in aged mice. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 755-765. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.013
- Bullock, K., Miller, M.M., Gal-Toth, J., Milner, T.A., Gottfried-Blackmore, A., Waters, E.M., ...McEwen, B.S. (2008). CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 508(5), 687-710. doi: 10.1002/cne.21668.
- Burger, C. (2010). Region-specific genetic alterations in the aging hippocampus: implications for cognitive aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2, 140. doi: 10.3389/fnagi.2010.00140
- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A.J., Dake, B., Murugaiyan, G., ...Weiner, H.L. (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3063-87. doi: 10.1172/JCI62636.
- Cahu, J., & Sola, B. (2013). A Sensitive Method to Quantify Senescent Cancer Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (78), 50494. doi: 10.3791/50494
- Caminschi, I., Lahoud M., & Shortman, K. (2009). Enhancing immune responses by targeting antigen to DC. *European Journal of Immunology*, 39(4), 931-8. doi: 10.1002/eji.200839035.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin-Teh, J., Lo, J.C.,...Lahoud, M.H. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*, 112(8), 3264-73. doi: 10.1182/blood-2008-05-155176.

- Canudas, A.M., Gutierrez-Cuesta, J., Rodríguez, M.I., Acuña-Castroviejo, D., Sureda, F.X., & Camins, A. & Pallàs, M. (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(12), 1300-4.
- Cardona, A. E., Huang, D., Sasse, M. E., & Ransohoff, R. M. (2006). Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(4), 1947-1951. doi: 10.1038/nprot.2006.327
- Carson, M., Reilly, C. R., Sutcliffe, J. G., & Lo, D. (1998). Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia*, 22(1), 72-85. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199801)22:1<72::AID-GLIA7>3.0.CO;2-A
- Casano, A. M., & Peri, F. (2015). Microglia: multitasking specialists of the brain. *Developmental Cell*, 32(4), 469-477. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.018
- Catalin, B., Alexandru, D., Albu, C., & Iancau, M. (2013). Microglia branching using a Sholl analysis method. *Current Health Sciences Journal*, 5.
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., & Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 132. doi: 10.1186/1742-2094-11-132
- Cerbai, F., Lana, D., Nosi, D., Petkova-Kirova, P., Zecchi, S., Brothers, H. M., . . . Giovannini, M. G. (2012). The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS One*, 7(9), e45250. doi: 10.1371/journal.pone.0045250
- Cipolla, M. (2009). *The Cerebral Circulation*. San Rafael, California: Morgan & Claypool Life Sciences.
- Conde, J. R., & Streit, W. J. (2006). Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury. *Neurobiology of Aging*, 27(10), 1451-61.
- Conde, J. R., & Streit, W. J. (2006). Microglia in the aging brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(3), 199-203.
- Coureuil, M., Lecuyer, H., Bourdoulous, S., & Nassif, X. (2017). A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers. *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), 149-159. doi: 10.1038/nrmicro.2016.178
- Crossman, A. R., & Neary, D. (2007). *Neuroanatomía, Texto y Atlas en Color* (E. Masson Ed. 3ª ed.): Barcelona.
- Chacón, J., Martínez, R., & Castellanos, M. (2015). *Análisis de datos en Psicología y Ciencias de la Salud*. Madrid: EOS (Instituto de Orientación Psicológica Asociados).
- Chen, G., & Nunez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 826-37. doi: 10.1038/nri2873.
- Chen, J., Buchanan, J., Sparkman, N., Godbout, J., Freund, G., Johnson, R., (2008). Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(3), 301-11.
- D'Agostino, P. M., Gottfried-Blackmore, A., Anandasabapathy, N., & Bulloch, K. (2012). Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 124(5), 599-614. doi: 10.1007/s00401-012-1018-0
- Damani, M.R., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Amaral, J., Fariss, R.N., & Wong, W.T. (2011). Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Ageing Cell*, 10(2), 263-76. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00660.x.
- Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St. John, J. A., Ekberg, J. A. K., . . . Beacham, I. R. (2014). Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 691-726. doi: 10.1128/CMR.00118-13
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 46-56. doi: 10.1038/nrn2297
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., . . . Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752-758. doi: 10.1038/nn1472
- Debacq-Chainiaux, F. (2008). Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGF1P-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 44, 1817-1832.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798-1806. doi: 10.1038/nprot.2009.191
- Decimo, I., Fumagalli, G., Berton, V., Krampera, M., & Bifari, F. (2012). Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *American Journal of Stem Cells*, 1(2), 92-105.
- del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I., & Förster, R. (2010). Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunological Reviews*, 234(1), 268-81. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00874.x.

- Del Valle, J., Duran-Vilaregut, J., Manich, G., Camins, A., Pallas, M., Vilaplana, J., & Pelegri, C. (2009). Time-course of blood-brain barrier disruption in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(1), 47-52. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.10.002
- Delerue, F., Sjollem, G., Whittle, B., Kruger, S., Andrews, D., & Gotz, J. (2013). Single nucleotide variants (SNVs) define senescence-accelerated SAMP8 mice, a model of a geriatric condition. *Journal of Alzheimer's Disease*, 36(2), 349-363. doi: 10.3233/JAD-130089
- den Haan, J. M., Arens, R., & van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, 162(2 Pt B), 103-112. doi: 10.1016/j.imlet.2014.10.011
- Diaz-Moreno, M., Hortiguera, R., Goncalves, A., Garcia-Carpio, I., Manich, G., Garcia-Bermudez, E., . . . Mira, H. (2013). *Abeta increases neural stem cell activity in senescence-accelerated SAMP8 mice. Neurobiology of Aging*, 34(11), 2623-38. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.011.
- Dik, M.G., Jonker, C., Hack, C.E., Smit, J.H., Comijs, H.C., Eikelenboom, P. (2005). Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*, 64(8), 1371-7.
- Dilger, R. N., & Johnson, R. W. (2008). Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 932-939. doi: 10.1189/jlb.0208108
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., . . . Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363-9367.
- Doetsch, F. (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1127-1134. doi: 10.1038/nn1144
- Drachman, D. A. (2006). Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology*, 67(8), 1340-52.
- Droge, W., & Schipper, H. M. (2007). Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, 6(3), 361-70.
- Elmore, M. R., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., . . . Green, K. N. (2014). Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 82(2), 380-397. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.040
- Enciu, A.M., Gherghiceanu, M., & Popescu, B.O. (2013). Triggers and effectors of oxidative stress at blood-brain barrier level: relevance for brain ageing and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 297512. doi: 10.1155/2013/297512.
- Engelhardt, B., & Coisne, C. (2011). Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*, 8(1), 4. doi: 10.1186/2045-8118-8-4
- Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A.M., Dobrenis, K., & Pollard, J.W. (2011). Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One*, 6(10), e26317. doi: 10.1371/journal.pone.0026317.
- Farrall, A. J., & Wardlaw, J. M. (2009). Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of Aging*, 30(3),337-52.
- Fenn, A. M., Henry, C., Huang, Y., Dugan, A., & Godbout, J. P. (2012). Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor-alpha expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 766-77. doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.003.
- Ferreira, T. A., Blackman, A. V., Oyrer, J., Jayabal, S., Chung, A. J., Watt, A. J., . . . van Meyel, D. J. (2014). Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nature Methods*, 11(10), 982-984. doi: 10.1038/nmeth.3125
- Ferrón, S. R., Andreu-Agulló, C., Mira, H., Sánchez, P., Ángeles Marqués-Torrejón, M., & Fariñas, I. (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nature Protocols*, 2(4), 849-859. doi: 10.1038/nprot.2007.104
- Fischer, H.G., & Reichmann, G. (2001). Brain Dendritic Cells and Macrophages/Microglia in Central Nervous System Inflammation. *The Journal of Immunology*, 166(4), 2717-2726. doi: 10.4049/jimmunol.166.4.2717
- Flanary, B.E., Sammons, N.W., Nguyen, C., Walker, D., & Streit, W.J. (2007). Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Research*, 10(1),61-74.
- Flanary, B.E., Streit, W.J. (2004). Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia*, 45(1), 75-88.
- Fleischer, B. (2004). Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of plasmodia. *Tropical Medicine & International Health*, 9(7), 755-756. doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01278.x

- Flood, D., Buell, S. J., Horwitz, G. J., & Coleman, P. D. (1987). Dendritic extent in human dentate gyrus granule cells in normal aging and senile dementia. *Brain research*, 402(2), 205-16.
- Flood, J. F., Farr, S. A., Kaiser, F. E., la Regina, M., & Morley, J. E. (1995). Age-related decrease of plasma testosterone in SAMP8 mice: Replacement improves age-related impairment of learning and memory. *Physiology & Behavior*, 57(4), 669-673.
- Ford, A.L., Goodsall, A.L., Hickey, W.F., & Sedgwick, J.D. (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *Journal of Immunology*, 154(9), 4309-21.
- Frank, M.G., Barrientos, R.M., Watkins, L.R., & Maier, S.F. (2010). Aging sensitizes rapidly isolated hippocampal microglia to LPS ex vivo. *Journal of Immunology*, 226(1-2), 181-4. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.022.
- Frank, M.G., Baratta, M.V., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., & Maier, S.F. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(1), 47-59.
- Fung, J., Frost, D., Chakrabarty, A., McLaurin, J. (2004). Interaction of human and mouse Abeta peptides. *J eurochem*, 91, 1398-1403.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., de Barreda, E.G., Ávila, J., & Hernández, F. (2011). Different susceptibility to neurodegeneration of dorsal and ventral hippocampal dentate gyrus: a study with transgenic mice overexpressing GSK3beta. *PLoS One*, 6(11), e27262. doi: 10.1371/journal.pone.0027262.
- Galea, I., Bechmann, I., & Perry, V. H. (2006). What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*, 28(1), 12-18. doi: 10.1016/j.it.2006.11.004
- Gambardella, S., Ferese, R., Biagioni, F., Busceti, C. L., Campopiano, R., Griguoli, A. M. P., . . . Fornai, F. (2017). The Monoamine Brainstem Reticular Formation as a Paradigm for Re-Defining Various Phenotypes of Parkinson's Disease Owing Genetic and Anatomical Specificity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 102. doi: 10.3389/fncel.2017.00102
- Ge, Y., Grossman, R.I., Babb, J.S., Rabin, M.L., Mannon, L.J., & Kolson, D.L. (2002). Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *American Journal of Neuroradiology*, 23(8), 1327-33.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661. doi: 10.1126/science.1178331
- Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.U., Siler, DA.,...Magnus, T. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 40(5), 1849-57. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534503.
- Gemma, C., Fister, M., Hudson, C., & Bickford, P.C. (2005). Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(7), 1751-6.
- Geng, Y.Q., Guan, J.T., Xu, X.H., & Fu, Y.C. (2010). Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(4), 866-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.011.
- Gengler, S., Hamilton, A., & Hölscher, C. (2010). Synaptic Plasticity in the Hippocampus of a APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Is Impaired in Old but Not Young Mice. *PLoS One*, 5(3), e9764. doi: 10.1371/journal.pone.0009764
- Ghosh, A. (2010). Brain APCs including microglia are only differential and positional polymorphs. *Annals of Neurosciences*, 17(4), 191-199. doi: 10.5214/ans.0972.7531.1017410
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., . . . Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. doi: 10.1126/science.1194637
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D.,...Merad, M. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3115-30. doi: 10.1084/jem.20091756.
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 7(8), a020537. doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
- Glenn, C.F., Chow, D.K., David, L., Cooke, C.A., Gami, M.S., Iser, W.B,...Wolkow, C.A. (2004). Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(12), 1251-60.

- Godbout, J.P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A.F., Berg, B.M., Kelley, K.W., & Johnson, R.W. (2005). Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB Journal*, 19(10),1329-31.
- Gomez-Nicola, D., & Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist*, 21(2), 169-184. doi: 10.1177/1073858414530512
- Gómez-Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., . . . Rodewald, H. R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547-551. doi: 10.1038/nature13989
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., . . . McColl, B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, 19(3), 504-516. doi: 10.1038/nn.4222
- Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 89-105. doi: 10.1007/s00401-009-0622-0
- Greter, M., Heppner, F. L., Lemos, M. P., Odermatt, B. M., Goebels, N., Laufer, T., . . . Becher, B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 11(3), 328-334. doi: 10.1038/nm1197
- Greter, M., Lelios, I., & Croxford, A. L. (2015). Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 6, 249. doi: 10.3389/fimmu.2015.00249
- Hanly, A., & Petito, C. K. (1998). HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system. *Human Pathology*, 29(1),88-93.
- Hao, J., Liu, R., Piao, W., Zhou, Q., Vollmer, T. L., Campagnolo, D. I., . . . Shi, F. D. (2010). Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1907-1921. doi: 10.1084/jem.20092749
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K,...Feng, L. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 95(18), 10896-901.
- Harry, G. J. (2013). Microglia During Development and Aging. *Pharmacology & therapeutics*, 139(3), 313-326. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.013
- Hart, A., Wyttenbach, A., Hugh Perry, V., & Teeling, J. L. (2012). Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: Grey versus white matter differences. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 754-765. doi: 10.1016/j.bbi.2011.11.006
- Hashimoto, D., Miller, J., & Merad, M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity*, 35(3), 323-335. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.007
- Hayakawa, N., Kato, H., & Araki, T. (2007). Age-related changes of astorocytes, oligodendrocytes and microglia in the mouse hippocampal CA1 sector. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(4), 311-316. doi: 10.1016/j.mad.2007.01.005
- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature Immunology*, 10(12), 1237-1244. doi: 10.1038/ni.1822
- Hein, A.M., Stasko, M.R., Matousek, S.B., Scott-McKean, J.J., Maier, S.F., Olschowka, J.A,...O'Banion, M.K. (2010). Sustained hippocampal IL-1beta overexpression impairs contextual and spatial memory in transgenic mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(2),243-53. doi: 10.1016/j.bbi.2009.10.002.
- Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M., & Godbout, J. P. (2009). Peripheral Lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3), 309-317. doi: 10.1016/j.bbi.2008.09.002
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 3, 31. doi: 10.3389/neuro.09.031.2009
- Hernandez-Ontiveros, D. G., Tajiri, N., Acosta, S., Giunta, B., Tan, J., & Borlongan, C. V. (2013). Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Frontiers in Neurology*, 4, 30. doi: 10.3389/fneur.2013.00030
- Hirasawa, T., Ohsawa, K., Imai, Y., Ondo, Y., Akazawa, C., Uchino, S., & Kohsaka, S. (2005). Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 357-362. doi: 10.1002/jnr.20480
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., . . . Ginhoux, F. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1167-1181. doi: 10.1084/jem.20120340

- Hof, P.R., Glannakopoulos, P., & Bouras, C. (1996). The neuropathological changes associated with normal brain aging. *Histology and Histopathology*, 11(4), 1075-88.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y.,... Schmidt, A.M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97(7),889-901.
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121-130. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004
- Hori, O., Brett, J., Slattey, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J.X., ...et al. (1995). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43),25752-61.
- Hosokawa, M., Klegeris, A., Maguire, J., & McGeer, P. L. (2003). Expression of complement messenger RNAs and proteins by human oligodendroglial cells. *Glia*, 42(4),417-23.
- Hosokawa, T. (2004). Immune system deficiencies in SAM. *International Congress Series*, 1260, 41-46. doi: [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)01565-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(03)01565-6)
- Hosokawa, T., Hosono, M., Higuchi, K., Aoike, A., Kawai, K., & Takeda, T. (1987). Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. I. Age-associated early decline in immune activities of cultured spleen cells. *Immunology*, 62(3),419-23.
- Huang, J.S., Guh, J.Y., Chen, H.C., Hung, W.C., Lai, Y.H., & Chuang, L.Y. (2001). Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 81(1), 102-13.
- Huang, W.C., Lin, Y.S., Wang, C.Y., Tsai, C.C., Tseng, H.C., Chen, C.L.,...Lin, C.F. (2009). Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. *Immunology*, 128(1 Suppl), e275-86. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02959.x.
- Hume, D. A. (2008). Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *The Journal of Immunology*, 181(9), 5829-5835. doi: 10.4049/jimmunol.181.9.5829
- Huysamen, C., Willment, J. A., Dennehy, K. M., & Brown, G. D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16693-16701. doi: 10.1074/jbc.M709923200
- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martínez-López, M., Blanco-Menéndez, N., Reis e Sousa, C., & Sancho, D. (2012). The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(5),1628-43. doi: 10.1172/JCI60660.
- Irvine, E., Drinkwater, L., Radwanska, K., Al-Qassab, H., Smith, M. A., O'Brien, M., . . . Giese, K. P. (2011). Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(6), 375-383. doi: 10.1101/lm.2111311
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57(1), 1-9. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0)
- Iyoda, T., & Inaba, K. (2002). [Immune regulation by dendritic cells]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 47(16 Suppl), 2133-8.
- Jessen, K. F., & Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, 286(5774),736-7.
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R.,...Vitorica, J. (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *Journal of Neuroscience*, 28(45),11650-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3024-08.2008.
- Jinno, S., Fleischer, F., Eckel, S., Schmidt, V., & Kosaka, T. (2007). Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia*, 55(13), 1334-47.
- Jucker, M., & Ingram, D. K. (1994). Age-Related Fibrillar Material in Mouse Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 719(1), 238-247. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb56832.x
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX(3)CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4106-4114.

- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T.,...Lang, R.A. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*, 17(2),211-20
- Jylhävä, J., Kotipelto, T., Raitala, A., Jylhä, M., Hervonen, A., & Hurme, M. (2011). Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(1-2),20-6. doi: 10.1016/j.mad.2010.11.001.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principios de Neurociencia* (4ª ed.). New York: McGraw-Hill.
- Karasawa, N., Nagatsu, I., Sakai, K., Nagatsu, T., Watanabe, K., & Onozuka, M. (1997). Immunocytochemical study of catecholaminergic neurons in the senescence-accelerated mouse (SAM-P8) brain. *Journal of Neural Transmission*, 104(11-12),1267-75.
- Karasawa, N., Yamawaki, Y., Nagatsu, T., Kawase, T., Nishiyama, K., Watanabe, K., ... Nagatsu, I. (1999). Age-associated changes in the dopamine synthesis as determined by GTP cyclohydrolase I inhibitor in the brain of senescence-accelerated mouse-prone inbred strains (SAMP8). *Neuroscience Research*, 35(1),31-6.
- Karman, J., Chu, H.H., Co, D.O., Seroogy, C.M., Sandor, M., & Fabry, Z. (2006). Dendritic cells amplify T cell-mediated immune responses in the central nervous system. *Journal of Immunology*, 177(11), 7750-60.
- Karperien, A., Ahammer, H., & Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 3. doi: 10.3389/fncel.2013.00003
- Kawamata, T., Akiguchi, I., Yagi, H., Irino, M., Sugiyama, H., Akiyama, H., ...Takeda, T. (1997). Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Experimental Gerontology*, 32(1-2),161-9.
- Kawamata, T., Akiguchi, I., Maeda, K., Tanaka, C., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda, T. (1998). Age-related changes in the brains of senescence-accelerated mice (SAM): Association with glial and endothelial reactions. *Microscopy Research and Technique*, 43(1), 59-67. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981001)43:1<59::AID-JEMT9>3.0.CO;2-X
- Kawas, C. H., & Corrada, M. M. (2006). Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. *Current Alzheimer Research*, 3(5),411-9.
- Kerrigan, A. M., & Brown, G. D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends in Immunology*, 32(4),151-6. doi: 10.1016/j.it.2011.01.002.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1), 10-18. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.023
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2013). Factors regulating microglia activation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 44. doi: 10.3389/fncel.2013.00044
- Kim, Y., Comte, I., Szabo, G., Hockberger, P., & Szele, F.G. (2009). Adult mouse subventricular zone stem and progenitor cells are sessile and epidermal growth factor receptor negatively regulates neuroblast migration. *PLoS One*, 4(12),e8122. doi: 10.1371/journal.pone.0008122.
- Kingston, D., Schmid, M. A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., & Manz, M. G. (2009). The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood*, 114(4), 835-843. doi: 10.1182/blood-2009-02-206318
- Klegeris, A., McGeer E.G. & McGeer, P.L. (2007). Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurology*, 20(3),351-7.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., & Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature Reviews Immunology*, 9(12), 833-844. doi: 10.1038/nri2669
- Kohman, R. A., Bhattacharya, T. K., Wojcik, E., & Rhodes, J. S. (2013). Exercise reduces activation of microglia isolated from hippocampus and brain of aged mice. *Journal of Neuroinflammation*, 10, 114. doi: 10.1186/1742-2094-10-114
- Kondo, S., Kohsaka, S., & Okabe, S. (2011). Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Molecular Brain*, 4, 27-27. doi: 10.1186/1756-6606-4-27
- Kongsui, R., Beynon, S.B., Johnson, S.J., & Walker, F.R. (2014). Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neuroinflammation*, 11,182. doi: 10.1186/s12974-014-0182-7.
- Kostulas, N., Li, H.L., Xiao, B.G., Huang, Y.M., Kostulas, V., & Link, H. (2002). Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 33(4),1129-34.

- Kozlowski, C., & Weimer, R. M. (2012). An Automated Method to Quantify Microglia Morphology and Application to Monitor Activation State Longitudinally In Vivo. *PLoS One*, 7(2), e31814. doi: 10.1371/journal.pone.0031814
- Kumagai, N., Chiba, Y., Hosono, M., Fujii, M., Kawamura, N., Keino, H.,...Hosokawa, M. (2007). Involvement of pro-inflammatory cytokines and microglia in an age-associated neurodegeneration model, the SAMP10 mouse. *Brain Research*, 1185,75-85.
- Kumar, V., Abbas, A., & Fausto, N. (2006). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. Madrid: Elsevier.
- Kumar, V.B., Farr, S.A., Flood, J.F., Kamlesh, V., Franko, M., Banks, W.A., & Morley, J.E. (2000). Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides*, 21(12), 1769-75.
- Kurokawa, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (2001). Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(17),14393-9.
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11). doi: 10.1101/cshperspect.a006320
- Lassmann, H., Zimprich, F., Vass, K., & Hickey, W.F. (1991). Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *Journal of Neuroscience Research*, 28(2),236-43.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1),151-70.
- Lawson, L. J., Perry V.H., & Gordon, S. (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48(2), 405-15.
- Lee, J.K., Schuchman, E.H., Jin, H.K., & Bae, J.S. (2012). Soluble CCL5 derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells and activated by amyloid beta ameliorates Alzheimer's disease in mice by recruiting bone marrow-induced microglia immune responses. *Stem Cells*, 30(7),1544-55. doi: 10.1002/stem.1125.
- Lindquist, R.L., Shakhbar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L., & Nussenzweig, M.C. (2004). Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nature Immunology*, 5(12),1243-50.
- Lipsitz, L. A. (2002). Dynamics of stability: the physiologic basis of functional health and frailty. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 57(3), B115-25.
- Lipsitz, L. A., & Goldberger, A. L. (1992). Loss of 'complexity' and aging. Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *Journal of the American Medical Association*, 267(13),1806-9.
- Lisak, R. P., Nedelkoska, L., Studzinski, D., Bealmear, B., Xu, W., & Benjamins, J. A. (2011). Cytokines regulate neuronal gene expression: differential effects of Th1, Th2 and monocyte/macrophage cytokines. *Journal of Neuroimmunology*, 238(1-2), 19-33. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.06.010
- Lister, J. P., & Barnes, C. A. (2009). Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Archives of Neurology*, 66(7), 829-33. doi: 10.1001/archneurol.2009.125.
- Liu, J.-T., Dong, M.-H., Zhang, J.-Q., Bai, Y., Kuang, F., & Chen, L.-W. (2015). Microglia and astroglia: the role of neuroinflammation in lead toxicity and neuronal injury in the brain. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 2(3), 131-137.
- Liu, J., Wang, M.W., Gu, P., Ma, Q.Y., Wang, Y.Y., Geng, Y.,...Zhu, A.P. (2010). Microglial activation and age-related dopaminergic neurodegeneration in MPTP-treated SAMP8 mice. *Brain research*, 1345, 213-20. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.043.
- Liu, J., Wang, Y. Y., Liu, L., Wang, Q. D., Yuan, Z. Y., Zhang, Z. X., . . . Wang, M. W. (2008). Damage to the nigrostriatal system in the MPTP-treated SAMP8 mouse. *Neuroscience Letters*, 448(2), 184-188. doi: 10.1016/j.neulet.2008.10.070
- Liu, L., & Shi, G. P. (2012). CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 94(1), 3-5. doi: 10.1093/cvr/cvs108
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Loane, D. J., & Byrnes, K. R. (2010). Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 7(4),366-77. doi: 10.1016/j.nurt.2010.07.002.
- London, A., Cohen, M., & Schwartz, M. (2013). Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 34. doi: 10.3389/fncel.2013.00034

- Long, J.M., Kalehua, A.N., Muth, N.J., Calhoun, M.E., Jucker, M., Hengemihle, J.M.,...Mouton, P.R. (1998). Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 19(5), 497-503.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Luo, X., & Chen, S.-D. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Translational Neurodegeneration*, 1, 9-9. doi: 10.1186/2047-9158-1-9
- Luo, X., Ding, J., & Chen, S. D. (2010). Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 5,12. doi: 10.1186/1750-1326-5-12.
- Lv, M., Liu, Y., Zhang, J., Sun, L., Liu, Z., Zhang, S., . . . Su, Z. (2011). Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neuroscience*, 176, 162-172. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.066>
- MacDonald, K.P., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C.,...Hume, D.A. (2010). An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*, 116(19), 3955-3963.
- MacDonald, K., Rowe, V., Bofinger, H. M., Thomas, R., Sasmono, T., Hume, D. A., & Hill, G. R. (2005). The Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Is Expressed on Dendritic Cells during Differentiation and Regulates Their Expansion. *The Journal of Immunology*, 175(3), 1399-1405. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1399
- Maia, L.F., Kaeser, S.A., Reichwald, J., Hruscha, M., Martus, P., Staufienbiel, M.,...Jucker, M. (2013). Changes in amyloid-beta and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Science Translational Medicine*, 5(194),194re2. doi: 10.1126/scitranslmed.3006446.
- Malik, M., Chiles, J. 3rd., Xi, H.S., Medway, C., Simpson, J., Potluri, S., . . . Estus, S. (2015). Genetics of CD33 in Alzheimer's disease and acute myeloid leukemia. *Human Molecular Genetics*, 24(12),3557-70. doi: 10.1093/hmg/ddv092.
- Manich, G., Cabezón, I., Auge, E., Pegleri, C., & Vilaplana, J. (2016). Periodic acid-Schiff granules in the brain of aged mice: From amyloid aggregates to degenerative structures containing neo-epitopes. *Ageing Research Reviews*, 27, 42-55. doi: 10.1016/j.arr.2016.03.001
- Manich, G., del Valle, J., Cabezón, I., Camins, A., Pallàs, M., Pegleri, C. & Vilaplana, J. (2014). Presence of a neo-epitope and absence of amyloid beta and tau. *AGE*, 36(1), 151-65. doi: 10.1007/s11357-013-9560-9.
- Manich, G., del Valle, J., Cabezón, I., Camins, A., Pallas, M., Pegleri, C., & Vilaplana, J. (2013). Presence of a neo-epitope and absence of amyloid beta and tau protein in degenerative hippocampal granules of aged mice. *Age (Dordr)*, 36(1), 151-165. doi: 10.1007/s11357-013-9560-9
- Markham, J. A., McKian, K.P., Stroup, T. S., & Juraska, J. M. (2005). Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. *Hippocampus*, 15(1), 97-103.
- Martin, E. D., Sanchez-Perez, A., Trejo, J. L., Martin-Aldana, J. A., Cano Jaimez, M., Pons, S., . . . Burks, D. J. (2012). IRS-2 Deficiency impairs NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Cerebral Cortex*, 22(8), 1717-1727. doi: 10.1093/cercor/bhr216
- Masocha, W. (2009). Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *Journal of Neuroimmunology*, 214(1-2), 78-82. doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.06.022
- Matyszak, M.K., Lawson, L.J., Perry, V.H., & Gordon, S. (1992). Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens. *Journal of Neuroimmunology*, 40(2-3),173-81.
- Matyszak, M. K., & Perry, V. H. (1996). The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*, 74(2),599-608.
- McEwen, B. S. (1999). Stress and the aging hippocampus. *Frontiers Neuroendocrinology*, 20(1), 49-70.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Tago, H., & McGeer, E.G. (1987). Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neuroscience Letters*, 79(1-2), 195-200.
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H., & Miller, S. D. (2005). Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 11(3), 335-339. doi: 10.1038/nm1202
- McMenamin, P. G. (1999). Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *The Journal of comparative neurology*, 405(4), 553-562.

- McMenamin, P.G., Wealhall, R.J., Deverall, M., Cooper, S.J., & Griffin, B. (2003). Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell and Tissue Research*, 313(3), 259-69.
- Meeker, R. B., Williams, K., Killebrew, D. A., & Hudson, L. C. (2012). Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adhesion & Migration*, 6(5), 390-6. doi: 10.4161/cam.21054.
- Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 123-40.
- Miller, G., Pillarisetty, V. G., Shah, A. B., Lahrs, S., & DeMatteo, R. P. (2003). Murine Flt3 Ligand Expands Distinct Dendritic Cells with Both Tolerogenic and Immunogenic Properties. *The Journal of Immunology*, 170(7), 3554-3564. doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3554
- Miyamoto, M. (1997). Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Experimental Gerontology*, 32(1-2), 139-48.
- Miyamoto, M., Kiyota, Y., Nishiyama, M., & Nagaoka, A. (1992). Senescence-accelerated mouse (SAM): age-related reduced anxiety-like behavior in the SAM-P/8 strain. *Physiology Behavior*, 51(5), 979-85.
- Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y., & Takeda, T. (1986). Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiology Behavior*, 38(3), 399-406.
- Mooney, J. E., Rolfe, B. E., Osborne, G. W., Sester, D. P., van Rooijen, N., Campbell, G. R., . . . Campbell, J. H. (2010). Cellular plasticity of inflammatory myeloid cells in the peritoneal foreign body response. *American Journal of Pathology*, 176(1), 369-380. doi: 10.2353/ajpath.2010.090545
- Morley, J., Armbricht, H. J., Farr, S. A., & Kumar, V. B. (2012). The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(5), 650-656. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.11.015
- Morley, J.E., Kumar, V.B., Bernardo, A.E., Farr, S.A., Uezu, K., Tumosa, N., & Flood, J.F. (2000). Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides*, 21(12), 1761-7.
- Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E., & Ingram, D.K. (2002). Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain research*, 956(1), 30-5.
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 26(3), 349-54. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.05.010
- Muldoon, L.L., Alvarez, J.I., Begley, D.J., Boado, R.J., Del Zoppo, G.J., Doolittle, N.D.,...Neuwelt, E.A. (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(1),13-21. doi: 10.1038/jcbfm.2012.153.
- Murphy, K. M. (2013). Transcriptional control of dendritic cell development. *Advances in Immunology*, 120, 239-67. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00009-0.
- Murray, C. A., & Lynch, M. A. (1998). Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 18(8), 2974-81.
- Nakamura, S., Akguchi, I., Seriu, N., Ohnishi, K., Takemura, M., Ueno, M.,...Hosokawa, M. (1995). Monoamine oxidase-B-positive granular structures in the hippocampus of aged senescence-accelerated mouse (SAMP8). *Acta Neuropathologica*, 90(6), 626-32.
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annual Review of Immunology* 32, 367-402. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120240
- Nesterov, E.E., Skoch, J., Hyman, B.T., Klunk, W.E., Bacska, B.J., & Swager, T.M. (2005). In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(34), 5452-6.
- Nie, L., & Chen, X. (2014). Structural and functional photoacoustic molecular tomography aided by emerging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 43(20), 7132-7170. doi: 10.1039/c4cs00086b
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726),1314-8.
- Nishimura, Y., Hosokawa, T., Hosono, M., Baba, M., & Hosokawa, M. (2002). Insufficient interleukin-2 production from splenic CD4+ T cells causes impaired cell proliferation and early apoptosis in SAMP1, a strain of senescence-accelerated mouse. *Immunology*, 107(2), 190-8.
- Nishiyama, A., Suzuki, R., & Zhu, X. (2014). NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 133. doi: 10.3389/fnins.2014.00133
- Nishiyama, A., Yang, Z., & Butt, A. (2005). Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *Journal of Anatomy*, 207(6), 687-93.

- Njie, E.G., Boelen, E., Stassen, F.R., Steinbusch, H.W., Borchelt, D.R., & Streit, W.J. (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiology of Aging*, 33(1), 195.e1-12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.008.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., & Kriegstein, A. R. (2007). Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis. *Archives of neurology*, 64(5), 639-42.
- Norden, D. M., & Godbout, J. P. (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 19-34. doi: 10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x.
- Ohgami, T., Kitamoto, T., Shin, R.W., Kaneko, Y., Ogomori, K., & Tateishi, J. (1991). Increased senile plaques without microglia in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 81(3), 242-7.
- Olah, M., Biber, K., Vinet, J., & Boddeke, H.W. (2011). Microglia phenotype diversity. *CNS & Neurological Disorders*, 10(1), 108-18.
- Olovnikov, A. M. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Experimental Gerontology*, 31(4), 443-8.
- Owens, T., Bechmann, I., & Engelhardt, B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(12), 1113-21. doi: 10.1097/NEN.0b013e31818f9ca8.
- Pallàs, M. (2012). Senescence-Accelerated Mice P8: A Tool to Study Brain Aging and Alzheimer's Disease in a Mouse Model. *ISRN Cell Biology*, 1-12. doi: 10.5402/2012/917167
- Pallas, M., Camins, A., Smith, M.A., Perry, G., Lee, H.G., & Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *Journal of Alzheimer's Disease*, 15(4), 615-24.
- Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Söderström, M., & Link, H. (2001). Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*, 124(Pt 3), 480-92.
- Pasqualetti, G., Brooks, D.J., & Edison, P. (2015). The role of neuroinflammation in dementias. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 15(4), 17. doi: 10.1007/s11910-015-0531-7.
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2004). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Londres: Elsevier.
- Peinado, M.A., Quesada, A., Pedrosa, J.A., Torres, M.I., Martinez, M., Esteban, F.J.,...Peinado, J.M. (1998). Quantitative and ultrastructural changes in glia and pericytes in the parietal cortex of the aging rat. *Microscopy Research and Technique*, 43(1), 34-42.
- Perez-Pouchoulen, M., VanRyzin, J. W., & McCarthy, M. M. (2015). Morphological and Phagocytic Profile of Microglia in the Developing Rat Cerebellum(1,2,3). *eNeuro*, 2(4). doi: 10.1523/ENEURO.0036-15.2015
- Perry, V., Matyszak M.K., & Fearn, S. (1993). Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*, 7(1), 60-7.
- Perry, V., & Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in Immunopathology*, 35(5), 601-612. doi: 10.1007/s00281-013-0382-8
- Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature Reviews Immunology*, 7(2), 161-7.
- Perry, V. H., & Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol*, 35(5), 601-612. doi: 10.1007/s00281-013-0382-8
- Pino, P. A., & Cardona, A. E. (2011). Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *Journal of visualized experiments*, (48). doi: 10.3791/2348
- Pisacane, A. M., Picciotto, F., & Risio, M. (2007). CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cellular Oncology*, 29(1), 59-66.
- Pooley, J. L., Heath, W.R., & Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *Journal of Immunology*, 166(9), 5327-30.
- Poon, H.F., Castegna, A., Farr, S.A., Thongboonkerd, V., Lynn, B.C., Banks, W.A.,...Butterfield, D.A. (2004). Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience*, 126(4), 915-26.
- Poulin, L.F., Rey, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M.,...Reis e Sousa, C. (2012). DNCR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood*, 119(25), 6052-62. doi: 10.1182/blood-2012-01-406967.

- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L.,...Reis e Sousa, C. (2010). Characterization of human DNCR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), 1261-71. doi: 10.1084/jem.20092618.
- Powers, D.C., Morley, J.E., & Flood, J.F. (1992). Age-related changes in LFA-1 expression, cell adhesion, and PHA-induced proliferation by lymphocytes from senescence-accelerated mouse (SAM)-P/8 and SAM-R/1 substrains. *Cellular Immunology*, 141(2), 444-56.
- Prinz, M., Erny, D., & Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology*, 18(4), 385-392. doi: 10.1038/ni.3703
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(5), 300-312. doi: 10.1038/nrn3722
- Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S. S., & Ransohoff, R. M. (2011). Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 14(10), 1227-1235. doi: 10.1038/nn.2923
- Probst, H.C., Tschannen, K., Odermatt, B., Schwendener, R., Zinkernagel, R.M., & Van Den Broek, M. (2005). Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 141(3), 398-404.
- Prodinger, C., Bunse, J., Krüger, M., Schiefenhövel, F., Brandt, C., Laman, J.D.,...Bechmann, I. (2011). CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathologica*, 121(4), 445-58. doi: 10.1007/s00401-010-0774-y.
- Püntener, U., Booth, S.G., Perry, V.H., & Teeling, J.L. (2012). Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 146. doi: 10.1186/1742-2094-9-146.
- Pyapali, G. K., & Turner, D. A. (1996). Increased dendritic extent in hippocampal CA1 neurons from aged F344 rats. *Neurobiology of Aging*, 17(4), 601-11.
- Qin, L., Wu, X., Block, M. L., Liu, Y., Breese, G., Hong, J., . . . Crews, F. T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55(5), 453-62.
- Quintana, E., Fernandez, A., Velasco, P., de Andres, B., Liste, I., Sancho, D., . . . Cano, E. (2015). DNCR-1(+) dendritic cells are located in meningeal membrane and choroid plexus of the noninjured brain. *Glia*, 63(12), 2231-2248. doi: 10.1002/glia.22889
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., . . . Jucker, M. (2006). Aβ42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Reports*, 7(9), 940-946. doi: 10.1038/sj.embor.7400784
- Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321), 253-262. doi: 10.1038/nature09615
- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 12(9), 623-35. doi: 10.1038/nri3265.
- Rapp, P. R., & Gallagher, M. (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9926-9930.
- Rasband, W. S. (1997-2016). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Recuperado de: <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Chiappelli, M., Montesi, F., Tumini, E.,...Patterson, C. (2007). Blood inflammatory markers and risk of dementia: The Conselice Study of Brain Aging. *Neurobiology of Aging*, 28(12), 1810-20.
- Río-Hortega, P. (1921). *El tercer elemento de los centros nerviosos: histogénesis y evolución normal : éxodo y distribución regional de la microglia*. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 11, 213-268.
- Robinson, A. J., & Goldstein, R. (2007). The cisterna magna septa: vestigial remnants of Blake's pouch and a potential new marker for normal development of the rhombencephalon. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 26(1), 83-95.
- Rodriguez-Callejas, J., Fuchs, E., & Perez-Cruz, C. (2016). Evidence of Tau Hyperphosphorylation and Dystrophic Microglia in the Common Marmoset. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 315. doi: 10.3389/fnagi.2016.00315
- Rogers, J., Luber-Narod, J., Styren, S.D., & Civin, W.H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 9(4), 339-49.

- Rose, M. L. (1998). Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(9), 965-78.
- Rothermel, A.L., Wang, Y., Schechner, J., Mook-Kanamori, B., Aird, W.C., Pober, J.S.,...Johnson, D.R. (2004). Endothelial cells present antigens in vivo. *BMC Immunology*, 5,5.
- Rupp, N.J., Wegenast-Braun, B.M., Radde, R., Calhoun, M.E., & Jucker, M. (2011). Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local, but not global neuron loss in APPPS1 transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 32(12), 2324.e1-6. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.014. Epub 2010 Oct 22.
- Salat, D.H., Buckner, R.L., Snyder, A.Z., Greve, D.N., Desikan, R.S., Busa, E.,...Fischl, B. (2004). Thinning of the cerebral cortex in aging. *Cerebral Cortex*, 14(7), 721-30.
- Sancho, D., Joffre, O. P., Keller, A. M., Rogers, N. C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., . . . Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 458(7240), 899-903. doi: 10.1038/nature07750
- Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O. P., Schulz, O., Rogers, N. C., Pennington, D. J., . . . Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2098-2110. doi: 10.1172/JCI34584
- Sandhir, R., Onyschuk, G., Berman, N. (2008). Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology*, 213(2), 372-80. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.06.013.
- Sasaki, A., Yamaguchi, H., Ogawa, A., Sugihara, S., Nakazato, Y. (1997). Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathologica*, 94(4), 316-22.
- Sasmono, R.T., Oceandy, D., Pollard, J.W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B.J., ...Hume, D.A. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood*, 101(3), 1155-1163.
- Sastre-Moreno, G., Pryor, J. M., Moreno-Onate, M., Herrero-Ruiz, A. M., Cortes-Ledesma, F., Blanco, L., . . . Ruiz, J. F. (2017). Regulation of human pollambda by ATM-mediated phosphorylation during non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, 51, 31-45. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.01.004
- Schilling, T., & Eder, C. (2014). Microglial K(+) channel expression in young adult and aged mice. *Glia*, 63(4), 664-72. doi: 10.1002/glia.22776.
- Schoenen J. (1982). The dendritic organization of the human spinal cord: the dorsal horn. *Neuroscience*. (9), 2057-87.
- Schram, M.T., Euser, S.M., de Craen, A.J., Witteman, J.C., Frölich, M., Hofman, A.,...Westendorp RG. (2007). Systemic markers of inflammation and cognitive decline in old age. *Journal of the American Geriatrics Society*, 55(5), 708-16.
- Schraml, B.U., van Blijswijk, J., Zelenay, S., Whitney, P.G., Filby, A., Acton, S.E.,...Reis e Sousa, C. (2013). Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell*, 154(4), 843-58. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.014.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K.,...Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 336(6077), 86-90. doi: 10.1126/science.1219179.
- Schulz, O., & Reis e Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology*, 107(2), 183-9.
- Schwartz, J. R. L., & Roth, T. (2008). Neurophysiology of Sleep and Wakefulness: Basic Science and Clinical Implications. *Current Neuropsychopharmacology*, 6(4), 367-378. doi: 10.2174/157015908787386050
- Schwartz, M., & Deczkowska, A. (2016). Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, 37(10), 668-679. doi: 10.1016/j.it.2016.08.001
- Serafini, B., Columba-Cabezas, S., Di Rosa, F., & Aloisi, F. (2000). Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *American Journal of Pathology*, 157(6), 1991-2002.
- Serneels, L., Van Biervliet, J., Craessaerts, K., Dejaegere, T., Horré, K., Van Houtvin, T.,...De Strooper B. (2009). gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science*, 324(5927), 639-42. doi: 10.1126/science.1171176.
- Serot, J.M., Christmann, D., Dubost, T., & Couturier, M. (1997). Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 63(4), 506-8.
- Shapiro, L.A., Perez, Z.D., Foresti, M.L., Arisi, G.M., & Ribak, C.E. (2009). Morphological and ultrastructural features of Iba1-immunolabeled microglial cells in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Research*, 1266, 29-36. doi: 10.1016/j.brainres.2009.02.031.

- Shechter, R., London, A., & Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 206-18. doi: 10.1038/nri3391.
- Sheng, J. G., Mrak, R.E., & Griffin, W. S. (1997). Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms. *Acta Neuropathologica*, 94(1), 1-5.
- Sheng, J. G., Mrak, R.E., & Griffin, W. S. (1998). Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathologica*, 95(3), 229-34.
- Shimada, A., & Hasegawa-Ishii, S. (2011). Senescence-accelerated Mice (SAMs) as a Model for Brain Aging and Immunosenescence. *Aging and Disease*, 2(5), 414-435.
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy*, 87(Pt 4), 387-406.381.
- Shortman, K., & Heath, W. R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological Reviews*, 234(1), 18-31. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A. C., McEwen, B. S., & Bulloch, K. (2007). Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia*, 55(4), 412-424. doi: 10.1002/glia.20468
- Simard, A. R., & Rivest, S. (2007). Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *Journal of Comparative Neurology*, 504(6), 716-729. doi: 10.1002/cne.21469
- Sixt, M., Engelhardt, B., Pausch, F., Hallmann, R., Wendler, O., & Sorokin, L.M. (2001). Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Cell Biology*, 153(5), 933-46.
- Skarica, M., Wang, T., McCadden, E., Kardian, D., Calabresi, P. A., Small, D., & Whartenby, K. A. (2009). Signal Transduction Inhibition of APCs Diminishes Th17 and Th1 Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(7), 4192-4199. doi: 10.4049/jimmunol.0803631
- Smith, R. G., Betancourt, L., & Sun, Y. (2005). Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocrine Reviews*, 26(2), 203-50.
- Solovjov, D. A., Pluskota, E., & Plow, E. F. (2005). Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1336-1345. doi: 10.1074/jbc.M406968200
- Sowell, E.R., Peterson, B.S., Thompson, P.M., Welcome, S.E., Henkenius, A.L., & Toga, A.W. (2003). Mapping cortical change across the human life span. *Nature Neuroscience*, 6(3), 309-15.
- Stewart, J.C., Rand, K.L., Muldoon, M.F., & Kamarck, T.W. (2009). A prospective evaluation of the directionality of the depression-inflammation relationship. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(7), 936-44. doi: 10.1016/j.bbi.2009.04.011.
- Stichel, C. C., & Luebbert, H. (2007). Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiology of Aging*, 28(10), 1507-21.
- Streit. (2006). Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends in Neurosciences*, 29(9), 506-10.
- Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(4):475-85. doi: 10.1007/s00401-009-0556-6.
- Streit, W., Braak, H., Xue, Q. S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(4), 475-485. doi: 10.1007/s00401-009-0556-6
- Streit, W., Sammons, N., Kuhns, A., Kuhns, A., & Sparks, D. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, 45(2), 208-12.
- Streit, W., & Xue, Q.-S. (2010). The Brain's Aging Immune System. *Aging and Disease*, 1(3), 254-261.
- Streit, W., Xue, Q.-S., Tischer, J., & Bechmann, I. (2014). Microglial pathology. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 142. doi: 10.1186/s40478-014-0142-6
- Streit, W. J., Sammons, N. W., Kuhns, A. J., & Sparks, D. L. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, 45(2), 208-212. doi: 10.1002/glia.10319
- Sureda, F.X., Gutierrez-Cuesta, J., Romeu, M., Mulero, M., Canudas, A.M., Camins, A.,...Pallàs, M. (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Experimental Gerontology*, 41(4), 360-7.

- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2013). *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. [Oxford]: Churchill Livingstone Elsevier.
- Syed, M., Phulwani, N. K., & Kielian, T. (2007). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 103(4), 1461-1471. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04838.x
- Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research*, 34(4), 639-659. doi: 10.1007/s11064-009-9922-y
- Takeda, T., Hosokawa, M., & Higuchi, K. (1991). Senescence-Accelerated Mouse (SAM): A Novel Murine Model of Accelerated Senescence. *Journal of the American Geriatrics Society*, 39(9), 911-919. doi: 10.1111/j.1532-5415.1991.tb04460.x
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., . . . Yamamuro, T. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, 17(2), 183-194.
- Takeda, T., Hosokawa, M. F., & Higuchi, K. (1991). Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *Journal of the American Geriatrics Society*, 39(9), 911-9.
- Takemura, M., Nakamura, S., Akiguchi, I., Ueno, M., Oka, N., Ishikawa, S., . . . Takeda, T. (1993). Beta/A4 proteinlike immunoreactive granular structures in the brain of senescence-accelerated mouse. *The American Journal of Pathology*, 142(6), 1887-1897.
- Tanaka, J., Okuma, Y., Tomobe, K., & Nomura, Y. (2005). The Age-Related Degeneration of Oligodendrocytes in the Hippocampus of the Senescence-Accelerated Mouse (SAM) P8: A Quantitative Immunohistochemical Study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(4), 615-618. doi: 10.1248/bpb.28.615
- Terrando, N., Rei Fidalgo, A., Vizcaychipi, M., Cibelli, M., Ma, D., Monaco, C.,...Maze, M. (2010). The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Critical Care*, 14(3), R88. doi: 10.1186/cc9019.
- Tha, K.K., Okuma, Y., Miyazaki, H., Murayama, T., Uehara, T., Hatakeyama, R.,...Nomura, Y. (2000). Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Research*, 885(1), 25-31.
- Theriault, P., & Rivest, S. (2016). Microglia: Senescence Impairs Clearance of Myelin Debris. *Current Biology*, 26(16), R772-5. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.066.
- Ting, J. P., & Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, 109 Suppl:S21-33.
- Tischer, J., Krueger, M., Mueller, W., Staszewski, O., Prinz, M., Streit, W.J. & Bechmann, I. (2016). Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. *Glia*, 64(9),1562-72. doi: 10.1002/glia.23024.
- Toft-Hansen, H., Buist, R., Sun, X.J., Schellenberg, A., Peeling, J., & Owens, T. (2006). Metalloproteinases control brain inflammation induced by pertussis toxin in mice overexpressing the chemokine CCL2 in the central nervous system. *Journal of Immunology*, 177(10), 7242-9.
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M.,...Kosaka, K. (2002). Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 124(1-2), 83-92.
- Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., . . . Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex., *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 12. doi: 10.1186/1742-2094-11-12
- Town, T., Laouar, Y., Pittenger, C., Mori, T., Szekely, C.A., Tan, J.,...Flavell, R.A. (2008). Blocking TGF- β -Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nature Medicine*, 14(6), 681-7. doi: 10.1038/nm1781.
- Tremblay, M.È., Zettel, M.L., Ison, J.R., Allen, P.D., & Majewska, A.K. (2012). Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia*, 60(4), 541-58. doi: 10.1002/glia.22287.
- Tynan, R.J., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K.M., Pow, D.V.,...Walker, F.R. (2010). Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7), 1058-68. doi: 10.1016/j.bbi.2010.02.001.
- Udeochu, J.C., Shea, J.M., Villeda, S.A. (2016). Microglia communication: Parallels between aging and Alzheimer's disease. *Clinical & Experimental Neuroimmunology*, 7(2), 114-125.
- Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., & Barres, B.A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, 291(5504), 657-61.
- van Horssen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J.L., Peferoen, L.,...Amor S. (2012). Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 156. doi: 10.1186/1742-2094-9-156.

- van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., ...Lambrecht, B.N. (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(6), 981-91.
- VanGuilder, H., Bixler, G. V., Brucklacher, R. M., Farley, J. A., Yan, H., Warrington, J. P., . . . Freeman, W. M. (2011). Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 138. doi: 10.1186/1742-2094-8-138
- Verdonk, F., Roux, P., Flamant, P., Fiette, L., Bozza, F. A., Simard, S., . . . Danckaert, A. (2016). Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 153. doi: 10.1186/s12974-016-0614-7
- Verkhatsky, A., & Butt, A. (2013). *Glial Physiology and Pathophysiology*. Noida, India: Wiley-Blackwell.
- Verstraete, K., Vandriessche, G., Januar, M., Elegheert, J., Shkumatov, A. V., Desfosses, A., . . . Savvides, S. N. (2011). Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. *Blood*, 118(1), 60-68. doi: 10.1182/blood-2011-01-329532
- Vijg, J., & Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*, 454, 1065-1071.
- Vinet, J., Weering, H. R., Heinrich, A., Kalin, R. E., Wegner, A., Brouwer, N., . . . Biber, K. (2012). Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 27. doi: 10.1186/1742-2094-9-27
- von Bernhardi, R., Eugenin-von Bernhardi, L., & Eugenin, J. (2015). Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 124. doi: 10.3389/fnagi.2015.00124
- von Bernhardi, R., Tichauer J.F., & Eugenin, J. (2010). Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 112(5), 1099-114. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06537.x.
- Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H., Ueno, M., & Tarnawski, M. (1995). A quantitative immunocytochemical study of blood-brain barrier to endogenous albumin in cerebral cortex and hippocampus of senescence-accelerated mice (SAM). *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 33(4), 229-37.
- Walker, D. G., & Lue, L. F. (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's Research & Therapy*, 7(1), 56. doi: 10.1186/s13195-015-0139-9
- Walker, T., Michaelides, C., Ekonomou, A., Geraki, K., Parkes, H. G., Suessmilch, M., . . . So, P.-W. (2016). Dissociation between iron accumulation and ferritin upregulation in the aged substantia nigra: attenuation by dietary restriction. *Aging (Albany NY)*, 8(10), 2488-2506. doi: 10.18632/aging.101069
- Wang, X. & Michaelis, E. K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2,12. doi: 10.3389/fnagi.2010.00012
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guernonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., . . . Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature Immunology*, 9(6), 676-683. doi: 10.1038/ni.1615
- Wasserman, D., Sokolowski, M., Rozanov, V., & Wasserman, J. (2008). The CRHR1 gene: a marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *Genes, Brain and Behavior*, 7(1), 14-9.
- Wasserman, J., & Schlichter, L. (2008). White matter injury in young and aged rats after intracerebral hemorrhage. *Experimental Neurology*, 214(2), 266-75. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.08.010.
- Watowich, S. S., & Liu, Y. J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunological Reviews*, 238(1), 76-92. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00949.x
- Weller, R. O. (2005). Microscopic morphology and histology of the human meninges. *Morphologie*, 89(284), 22-34.
- Wilms, H., Zecca, L., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., & Lucius, R. (2007). Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Current Pharmaceutical Design*, 13(18), 1925-8.
- Wong, W. T. (2013). Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Frontiers in Cell Neuroscience*, 7, 22. doi: 10.3389/fncel.2013.00022
- Wynne, A.M., Henry, C.J., Huang, Y., Cleland, A., Godbout, J.P. (2010). Protracted downregulation of CX3CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7), 1190-201. doi: 10.1016/j.bbi.2010.05.011.
- Xiong, X., Barreto, G. E., Xu, L., Ouyang, Y. B., Xie, X., & Giffard, R. G. (2011). Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 42(7), 2026-2032. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.593772

BIBLIOGRAFÍA

- Yagi, H., Irino, M., Matsushita, T., Katoh, S., Umezawa, M., Tsuboyama, T.,...Takeda, T. (1989). Spontaneous spongy degeneration of the brain stem in SAM-P/8 mice, a newly developed memory-deficient strain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 48(5), 577-90.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A.,...Schmidt, A.M. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 382(6593), 685-91.
- Yang, N. C., & Hu, M. L. (2005). The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology*, 40(10), 813-819. doi: 10.1016/j.exger.2005.07.011
- Yasui, F., Ishibashi, M., Matsugo, S., Kojo, S., Oomura, Y., & Sasaki, K. (2003). Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neuroscience Letters*, 350(1), 66-8.
- Ye, S. M., & Johnson, R. W. (1999). Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *Journal of Neuroimmunology*, 93(1-2), 139-48.
- Yona, S., & Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current Opinion in Hematology*, 17(1), 53-9. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283324f80.
- Yoshioka, H., Yoshida, H., Doi, T., Muso, E., Ohshio, G., Higuchi, K., . . . Takeda, T. (1989). Autoimmune abnormalities in a murine model of accelerated senescence. *Clinical and Experimental Immunology*, 75(1), 129-135.
- Yousif, L. F., Di Russo, J., & Sorokin, L. (2013). Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), 101-110. doi: 10.4161/cam.22680
- Zhang, X., Surguladze, N., Slagle-Webb, B., Cozzi, A., Connor, JR (2006). Cellular iron status influences the functional relationship between microglia and oligodendrocytes. *Glia*, 54 (8), 795-804.
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.

ANEXO

DNGR-1⁺ Dendritic Cells are Located in Meningeal Membrane and Choroid Plexus of the Noninjured Brain

Elena Quintana,¹ Andrés Fernández,¹ Patricia Velasco,¹ Belén de Andrés,² Isabel Liste,³ David Sancho,⁴ María Luisa Gaspar,² and Eva Cano¹

The role and different origin of brain myeloid cells in the brain is central to understanding how the central nervous system (CNS) responds to injury. C-type lectin receptor family 9, member A (DNGR-1/CLEC9A) is a marker of specific DC subsets that share functional similarities, such as CD8 α ⁺DCs in lymphoid tissues and CD103⁺CD11b^{low}DCs in peripheral tissues. Here, we analyzed the presence of DNGR-1 in DCs present in the mouse brain (bDCs). *Dngr-1/Clec9a* mRNA is expressed mainly in the meningeal membranes and choroid plexus (m/Ch), and its expression is enhanced by fms-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), a cytokine involved in DC homeostasis. Using *Clec9a^{egfp/egfp}* mice, we show that Flt3L induces accumulation of DNGR-1-EGFP⁺ cells in the brain m/Ch. Most of these cells also express major histocompatibility complex class II (MHCII) molecules. We also observed an increase in specific markers of cDC CD8 α ⁺ cells such as *Batf-3* and *Irf-8*, but not of costimulatory molecules such as *Cd80* and *Cd86*, indicating an immature phenotype for these bDCs in the noninjured brain. The presence of DNGR-1 in the brain provides a potential marker for the study of this specific brain cell subset. Knowledge and targeting of brain antigen presenting cells (APCs) has implications for the fight against brain diseases such as neuroinflammation-based neurodegenerative diseases, microbe-induced encephalitis, and brain tumors such as gliomas.

GLIA 2015;63:2231–2248

Key words: C-type lectin receptors, myeloid cells, CD11c, Flt3L, neuroinflammation, Batf3

Introduction

The immune-privileged state of the brain has received renewed attention in recent years (Galea et al., 2007). Immune cells are today believed to contribute to the physiology of the nondiseased brain, and there is increasing evidence for the existence of distinct cells of myeloid origin in the brain with functions that are still not fully understood (Prinz et al., 2014 and references therein). Brain myeloid cells comprise microglia cells, perivascular, meningeal, and choroid plexus macrophages, periphery-derived monocytes, and brain dendritic cells (bDC). Parenchymal microglia is clearly implicated in the steady-state brain. Microglia cells in the healthy

brain have a small soma with extensive radial ramifications that actively survey the microenvironment (Nimmerjahn et al., 2005). They have a myeloid origin; they derive from embryonic yolk sac progenitors (Ginhoux et al., 2010) and are sustained by local progenitors (Ajami et al., 2007). A further focus of interest is the trafficking of leukocytes and monocytes through the meningeal and choroid plexus (m/Ch) barrier to patrol the healthy brain or contribute to repair after sterile or nonsterile CNS injury (Ajami et al., 2007; Ransohoff and Cardona, 2010; Shechter et al., 2013).

The existence of dendritic cells in the brain has been described before in noninjured rat and mouse m/Ch

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22889

Published online July 17, 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Received Dec 11, 2014, Accepted for publication June 24, 2015.

Address correspondence to E. Cano; Neuroinflammation Unit, Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km.2,2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain. E-mail: ecano@isciii.es

From the ¹Neuroinflammation Unit, Unidad Funcional De Investigación De Enfermedades Crónicas, Instituto De Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain; ²Department of Immunology, Centro Nacional De Microbiología, Instituto De Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Instituto De Salud Carlos III, Neural Regeneration Unit, Unidad Funcional De Investigación De Enfermedades Crónicas, Majadahonda, Madrid, Spain; ⁴Centro Nacional De Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

E. Quintana and A. Fernández contributed equally to this work.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

(McMenamin, 1999; Matyszak and Perry, 1996; McMenamin et al., 2003), in the EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) mouse model (Serafini et al. 2000; Fischer and Reichmann, 2001; McMahon et al., 2005), and in multiple sclerosis (MS) in the human brain (Prodinger et al., 2011). Recent data obtained with transgenic mouse lines confirm the existence of resident bDCs in the nondiseased mouse brain; for example, bDCs from transgenic CD11c-EYFP mice identified by EYFP expression colocalize with other immune markers commonly associated with DCs and microglia/macrophages (Axtell and Steinman, 2009; Bulloch et al., 2008; D’Agostino et al., 2012). Furthermore, bDC CD11c⁺ cells have been identified in CD11c-GFP mice (Jung et al., 2002; Prodinger et al., 2011). In the periphery, DCs are the antigen presenting cells (APC) that mediate T-cell immunity and tolerance. The DC network is complex and comprises several DC subsets, and DC development has been shown to be dependent on fms-like receptor tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) (Heath and Carbone, 2009; Watowich and Liu, 2010). The m/Ch barrier contains a population of Flt3L-dependent DCs akin to the CD8 α ⁺ subset of spleen conventional DCs (cDC) (Anandasabapathy et al., 2011). However, further work is needed to precisely characterize the DC subsets in the noninjured brain.

DNGR-1 (CLEC9A) is a C-type lectin receptor that specifically marks a functional subset of DCs defined by dependence on BATF-3, IRF-8, and Id2. Differentiated DCs expressing DNGR-1 include CD8 α ⁺ cDCs and CD103⁺ DCs in peripheral tissues (Huysamen et al., 2008; Iborra et al., 2012; Poulin et al., 2010; Poulin et al., 2012; Sancho

et al., 2008; Schraml et al. 2013). DNGR-1 is involved in recognizing death cell antigens (Sancho et al., 2009), and DNGR-1⁺ DCs could play a role in presentation of antigen to CD4⁺ T cells and cross-presentation to CD8⁺ T cells. *Dngr-1/Clec9a* mRNA has been examined in total human and mouse tissues, with the highest expression detected in human brain, thymus, and spleen (Huysamen and Brown, 2009), but the specific location of this expression in the brain has so far not been reported. In mouse tissues, different *Dngr-1* isoforms are detected in spleen DCs (Sancho et al., 2008). Here, we analyzed the distribution of brain myeloid cells and the expansion of a DNGR-1⁺ DC subset after treatment with Flt3L. DNGR-1⁺ DCs localize in meningeal membranes and choroid plexus (m/Ch) but are scarce in brain parenchyma (BP), and we show that DNGR-1 expression in the brain is increased in response to Flt3L. The tracking of DNGR-1⁺ DCs will facilitate future studies into the role of this DC subset in the brain.

Materials and Methods

Cells: B16 murine Flt3L-secreting tumor cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (Iborra et al., 2012).

Animals

The transgenic mouse line c-fms-EGFP (Csf1r-EGFP) (Sasmono et al., 2003; macgreen), mice expressing EGFP under the promoter of c-fms (CSF1R) are characterized by the expression of enhanced green fluorescence in brain myeloid cells. *Clec9a^{egfp/egfp}* mice (DNGR-1-deficient) (Sancho et al., 2009) on the C57BL/6 background were backcrossed more than 10 times to C57BL/6J-Crl. *Batf3^{-/-}* mice (Hildner et al., 2008) were backcrossed more than 10 times to the C57BL/6 background and further backcrossed with C57BL/6 mice at the CNIC to establish WT and *Batf3^{-/-}* colonies from the heterozygotes. Animal studies were approved by the local ethics committee. Mice were bred and maintained in animal facilities at the Instituto de Salud Carlos III. All animal procedures conformed to EU Directive 2010/63EU and Recommendation 2007/526/EC regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, enforced in Spanish law under Real Decreto 1201/2005.

Tissue Processing

For experiments involving immunocytochemistry, mice were deeply anesthetized by i.p. injection of a mixture of ketamine and xylazine and transcardially perfused with 25–30 mL of saline solution for 5 min, followed by 4% PFA (Sigma Aldrich, St Louis, MO), pH 7.4, in 0.1 M phosphate buffer (PB, Sigma). After perfusion with the fixative, brains were dissected out and postfixed with 4% PFA for 18–20 h at 4°C. After fixation, brains were rinsed in 0.1 M PB and placed in 15% glucose at 4°C until they sank, and then in 30% sucrose in PB at 4°C for 72 h. Finally, brains were embedded in tissue freezing medium (Tissue-Tek O.C.TTM, Sakura), frozen immediately in dry-ice-cooled 2-methylbutane (Sigma-Aldrich), and stored

| Abbreviations | |
|---------------|--|
| APC | antigen presenting cell |
| bDC | brain dendritic cells |
| BP | brain parenchyma |
| CNS | central nervous system |
| CSF | colony-stimulating factor |
| CSF1r | colony-stimulating factor 1 receptor |
| CTL | cytotoxic T lymphocyte |
| Dapi | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DC | dendritic cells |
| DNGR-1/CLEC9A | C-type lectin domain family 9, member A |
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| FBS | foetal bovine serum |
| FC | flow cytometry |
| FLT3-L | FMS-like tyrosine kinase 3 ligand |
| GFAP | glial fibrillary acidic protein |
| Iba1 | ionized calcium-binding adapter molecule 1 |
| IF | immunofluorescence |
| kDa | kiloDalton |
| m/Ch | meningeal membranes and choroid plexus |
| MHC | major histocompatibility complex |
| PB | Phosphate buffer |
| PBS | phosphate buffer saline |
| PFA | paraformaldehyde |

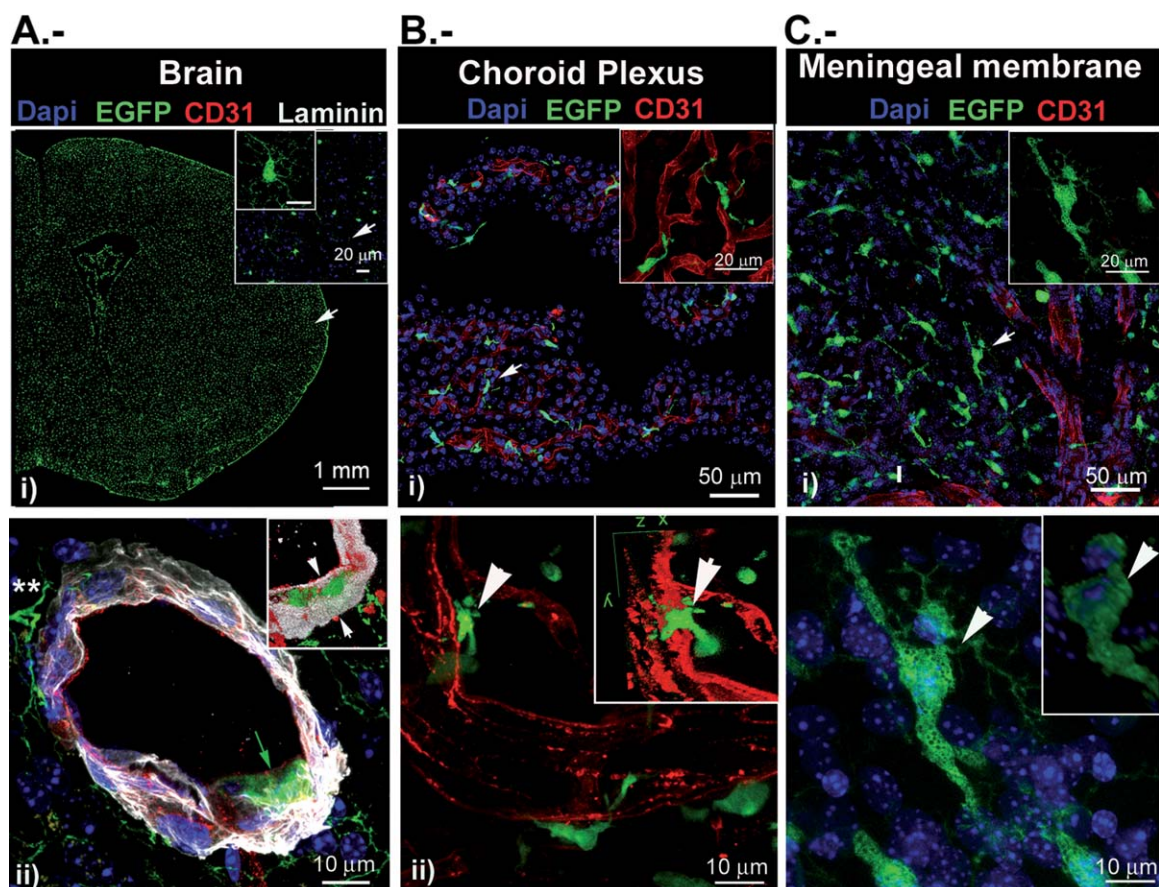


FIGURE 1: EGFP expression in Csf1r-EGFP transgenic mice. Nuclei are stained with Dapi (blue); brain microglia/macrophages from direct fluorescence of Csf1r-EGFP cells (green), CD31 positive cells labeled blood vessel (red), and pan-laminin staining for basement membranes (white). (A, panel i) Direct fluorescence map of adult mouse Csf1r-EGFP brain coronal sections (20 \times , 1.7 \times digital zoom). (B, panel i) Shows 40 \times magnifications of EGFP-positive cells and CD31-positive cells in choroid plexus. Inset shows 63 \times (3 \times digital zoom) magnification of cells marked with an arrow. (C, panel i) Shows 40 \times magnifications of EGFP-positive cells and CD31-positive cells in pia leptomeningeal membrane. Inset shows 63 \times (3 \times digital zoom) magnification of cells marked with an arrow. (A, panel ii) Confocal microscopy z-stack images of 30- μ m-thick cryostat sections showing brain blood vessel marked with an arrow in panel i (63 \times , 3 \times digital zoom). Double asterisks (**) mark a parenchymal Csf1r-EGFP-positive cells close to the blood vessel (juxtavascular) and green arrow marks a perivascular macrophage. Inset shows a 3D reconstruction of perivascular Csf1-EGFP positive cell. White arrows indicate both basement membranes (endothelial and parenchymal) around the Csf1-EGFP-positive cell. (B, panel ii) Confocal microscopy z-stack images of 30- μ m-thick cryostat sections, showing choroid plexus (63 \times , 3 \times digital zoom). (C, panel ii) Confocal microscopy z-stack images of upper 30 μ m from 80 μ m vibratome horizontal sections showing pia leptomeningeal membranes (63 \times , 3 \times digital zoom). Insets in panel ii show 3D reconstructions of arrowed cells. Images were obtained with a SP5 Leica TCS confocal fluorescent microscope. Scale bars are included in the images. Images are representative of the different brain localizations.

at -70°C . Coronal sections (30 μ m) were cut using a CM1950 cryostat (Leica Microsystems) and stored at -20°C until use. For the CD11c staining, mice were perfused for 1 min with saline followed by 4% ice-cold PFA and postfixation for not more than 8 h. The 3D reconstruction in Fig. 1 and the meningeal membrane studies were performed with 80 μ m vibratome horizontal sections (Leica VT1200s).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on frozen brain sections by standard indirect staining (primary antibody followed by a fluorescent secondary antibody) as described in (Serrano-Perez et al., 2011) but using phosphate as buffer and 10% FBS for blocking. Antibodies were diluted in 0.1 M PB containing 1% FBS (Hyclone), 0.06%

Triton-X100 (Sigma), and 150 mM glycine (Merck). Rabbit anti-Iba1 (1:100, Wako) was used to detect expression of microglia, Rat anti-mouse I-A/I-E (1:100, clone 2G9, B.D. Pharmingen) was used to detect antigen-presenting cells, Rabbit anti-pan-laminin (L9393 Sigma) was used to detect basal membrane, Rat anti-mouse CD31 (clone MEC13.3 BD Pharmingen) to detect endothelial cells, and biotin-anti-mouse CD11c (clone N418, Biolegend) to detect DCs. Samples stained with CD11c biotinylated antibodies were treated with the Biotin Blocking System (Vector Laboratories) before endogenous peroxidase activity was quenched with hydrogen peroxide. Anti-CD11c staining was detected with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin/Cy3-tyramide using the tyramide signal-amplification system (Perkin Elmer, Boston, MA) according to the manufacturer's instructions. The secondary antibodies used were

labeled with Cy3, 488, and 647 fluorochromes (Jackson Immunoresearch). Controls were conducted by omitting the primary antibody, MHC-II controls incorporate the isotype Rat IgG2a κ , and CD11c controls incorporate biotin-control isotype IgG. Slides were finally counterstained with DAPI (5 μ g/mL, Life technologies) and mounted in a mixture of Mowiol/50% DABCO (Sigma). Antibodies are described in Supporting Information, Table 1.

Confocal Microscopy and Analysis

Images were acquired on a Leica TCS SP5 inverted confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems). Brain maps in Fig. 1 were imaged using a 20 \times objective and a 1.7 \times digital zoom (4 μ m step size, 500 \times 500 pixel resolution). Other images were acquired using a 40 \times objective (1 μ m step size, 1024 \times 1024 pixel resolution) for standard images and a 63 \times objective with a 3 \times digital zoom (0.5 μ m step size, 1024 \times 1024 pixel resolution) for detailed images. Images are presented as average projections of z-stacks and keeping parameters constant using negative control slides stained with primary antibody to identify potential nonspecific, background fluorescence. Exceptions are mentioned in figure legends. Acquired z-stacks were background-subtracted with Leica LAS AF 2.6.3 software and secondary processed and analyzed using Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems) and ImageJ (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) for ROI quantification and cell counting. For 3D reconstructions, the plugging 3D viewer for ImageJ was used.

Cell Preparation

Mice with an age of 6–12 weeks with different genetic background as specified were left noninjected or injected subcutaneously (s.c.) in the flank with 5 \times 10⁶ B16 murine Flt3L-secreting tumor cells. Between days 12 and 16 after injection, when tumors measured approximately 1 cm², mice were sacrificed, and intracardiac perfusion was performed using phosphate buffered saline (PBS) with observed blanching of the spleen during 5 min at a speed of 5 mL/min. Complete brains and spleens were dissected and for most experiments meningeal (pia mater) membranes and choroid plexus (m/Ch) were carefully removed with fine tweezers. Brain tissue was finely minced into small pieces and treated with a specific protease mix depending on the tissue. For brain without m/Ch, cells were prepared as in Sierra et al. (2007) with modifications. Each brain, without the m/Ch and cerebellum, was digested in 5 mL of enzyme solution (20 units/mL papain (Worthington) and 0.025 units/mL DNase (Sigma) in buffer containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.5 mM EDTA, 25 mM glucose, and 1 mM L-cysteine, pH 7.5) for 30 min at room temperature (RT) with agitation. The brain homogenate was washed and filtered once through a 70- μ m filter to remove undigested fragments and then washed twice more, followed by centrifugation at 300g for 7 min. Cells were resuspended in 30% Percoll (GE Lifesciences) under 5 mL HBSS and centrifuged at 300g for 20 min at RT with slow acceleration and no brake. The pellet was collected and washed with HBSS (spin 300g, 7 min). All subsequent washes were performed with ice-cold PBS containing 2% (vol/vol) FBS. This preparation contains microglia/macrophage from

brain as in Carson et al. (1998), with the exception of those from meningeal membrane, choroid plexus, and cerebellum; we refer to this cell preparation as myeloid cells from brain without m/Ch. For m/Ch cell isolates, meningeal membranes plus choroid plexus of at least 3 animals were pooled in an Eppendorf containing 1 mL PBS. Tissue was treated with 2.5 mg/mL pronase (Roche) plus 0.025 units/mL DNase (Sigma) in PBS during 30 min at 37°C in a bath with mixing. This was followed by homogenization with gentle trituration using glass pipettes until an even homogenate was obtained. m/Ch homogenates were filtered and treated as above. For splenocytes isolation, spleens were mechanically disrupted and teased apart. Cells were collected and ammonium-chloride-potassium (ACK) lysis of red blood cells was followed by two washes and removal of undigested fibrous material by filtering through a 70- μ m cell strainer. All subsequent steps were performed at 4°C in PBS, 2% FBS.

Flow Cytometry

Single-cell suspensions were prepared as above and resuspended in staining buffer (2.5% FBS in Dulbecco's PBS; Biowhittaker, Lonza Group). Nonspecific binding to Fc γ receptors was blocked with 10 μ g/mL of 2.4G2 mAb (Fc block) (BD Biosciences). Staining followed standard protocols, and antibodies and reagents are listed in Supporting Information, Table 1. Fluorochrome-labeled antibodies specific for mouse CD45, CD11b, CD11c, and MHCII were from BD Biosciences or Biolegend. Mouse cell suspensions were incubated with Fc block and were then stained on ice-cold PBS supplemented with 2 mM EDTA, 2% FBS, and 0.02% sodium azide. Cells were analyzed on a FACSCANTO cytometer using FlowJo version 6.3.4 (Tree Star, Ashland, OR).

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Real-Time PCR

Total mRNA was isolated with TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Sciences, Spain). Total mRNA was quantified and reverse transcribed to cDNA with MMLV Transcriptase Reverse (Invitrogen), following the manufacturer's instructions except for the use of 300 ng of random primers and 4 units of RNase OUT (Invitrogen). Semiquantitative PCR of brain and spleen tissues was performed with the AmpliTaq Gold[®] kit (Applied Biosystems), using 5 ng of total cDNA and 1 μ M primers. Spleen samples were loaded at a dilution of 1/30 relative to brain samples to avoid image saturation. The actin primers were forward, GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA, and reverse, CTCCTTGATGTCACGCACGATTTC. Clec9a/Dngr-1 primers were forward, AGACTGCTTCACCACTCCAA, and reverse, CTTGGCACAATGGACAAGGT (Sancho et al., 2008).

Relative amounts of cDNA were analyzed by real-time PCR (RT-PCR) using the FAST SYBR-green system (Applied Biosystems). Each 15 μ L reaction volume included 5 ng total cDNA and 0.5 μ M of each primer. Mouse 36B4 was used as an internal control to normalize for variation in input RNA. Primers used are as described in Supporting Information, Table 2. The amount of target mRNA in samples was estimated by the 2- $\Delta\Delta$ CT relative quantification method (Livak and Schmittgen, 2001). Ratios were calculated between the amounts of mRNA from the different tissues.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software. The *p* values were calculated with the two-tailed Student's *t* test (**p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001). Data are presented as the means ± SEM of a number of experiments (*n*) indicated in each case.

Results

Myeloid Cells in the Noninjured Brain

We first analyzed the myeloid compartment present in the intact brain by confocal microscopy of coronal brain sections from mice expressing the *c-fms*-EGFP reporter construct. The *c-fms* gene encodes the receptor for mouse macrophage colony-stimulating factor (CSF1R/CD115), which in brain is expressed only in cells of myeloid origin (Sasmono et al. 2003). From hereon, we refer to this line as Csf1r-EGFP mice. CSF1R-EGFP⁺ cells were present throughout the brain in two distinct localizations, the parenchyma itself (BP) and in the perivascular spaces, as shown in (Fig. 1A, panels i and ii). CSF1R-EGFP⁺ cells were found in choroid plexus (Fig. 1B, panels i and ii) and in the pia mater meningeal membrane (Fig. 1C, panels i and ii). Interestingly, CSF1R-EGFP⁺ cells in these localizations have different morphologies: CSF1R-EGFP⁺ cells in the BP proper have a small soma with extensive radial ramifications and are very evenly distributed throughout the noninjured brain; in contrast, CSF1R-EGFP⁺ cells in the perivascular areas from the brain parenchyma have a more amoeboid morphology with fewer ramifications and were situated in close contact with the basement membrane of brain vessels (Fig. 1A, panel ii). CSF1R-EGFP⁺ cells from choroid plexus were as well brighter, amoeboid in shape, and they were situated in close contact with CD31⁺ blood vessels from the plexus as shown in Fig. 1B, panel ii. We analyzed the pia mater or pia leptomeninges (meningeal) sliced from the surface of the cerebral hemispheres from the Csf1r-EGFP mouse brains, and observed a dense network of CSF1R-EGFP⁺ cells that resemble the CD11b⁺ (OX-42) cells previously described in rat pia leptomeningeal membrane (McMenamin, 1999; McMenamin et al., 2003). To assess the situation of these CSF1R-EGFP⁺ cells, and to determine if they were situated on top of the pia mater or in the BP, we counterstained with an antibody that recognizes the glial fibrillary acidic protein (GFAP). This antibody stains the glial limitans membrane. In Supporting Information, Fig. 1s, we show that the CSF1R-EGFP⁺ cells constitute a barrier of cells situated in the meningeal membrane above the GFAP⁺ area. A widely used marker of brain microglia is the ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1), which recognizes a microglia/macrophage-specific calcium-binding protein (Ito et al., 1998). Analysis of Iba1 expression in noninjured Csf1r-EGFP brains revealed co-expression of Iba1 in

99 ± 0.7% of CSF1R-EGFP⁺ cells in brain (Supporting Information, Fig. 2s, panel A). Iba1^{low/-} CSF1R-EGFP⁺ cells were very rare in the brain itself, and the few that we found were next to blood vessels (data not shown). Analysis of m/Ch detected a population of Iba1^{low/-} CSF1R-EGFP⁺ cells, accounting for 7 ± 2% of the total CSF1R-EGFP⁺ cells in the choroid plexus (Supporting Information, Fig. 2s, panel B). We could not observe Iba1⁺ cells that were CSF1R-EGFP⁻. To analyze Iba1⁺ and CSF1R-EGFP⁺ in the meningeal (m) membranes, we used 80 μm horizontal vibratome sections, choosing the very first slide from the brains. In this brain localization, we observed CSF1R-EGFP⁺ cells that were clearly Iba1^{low/-} (Supp. Info., Fig. 2s, panel C); in fact, most of the very bright CSF1R-EGFP⁺ located in the pia leptomeningeal membrane were Iba1^{low/-}, and we could only see Iba1⁺ CSF1R-EGFP⁺ cells in the proper brain tissue.

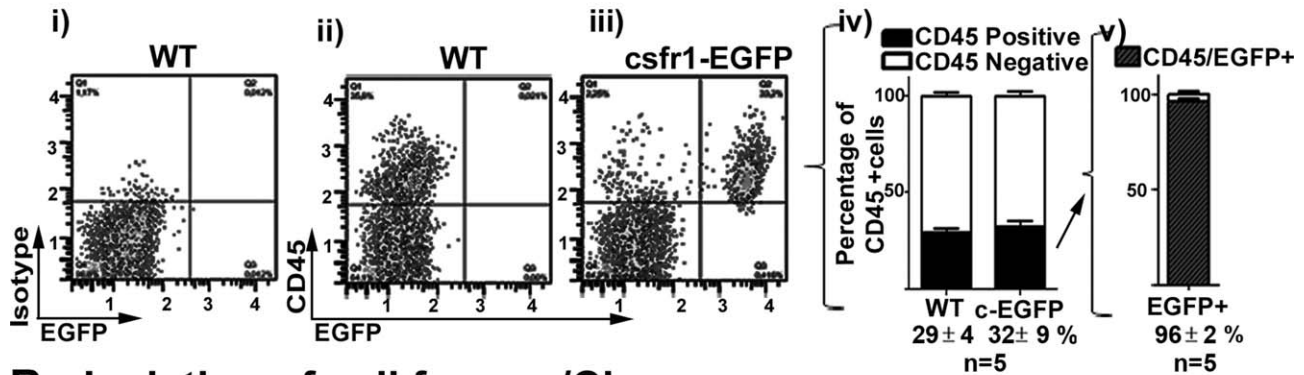
To further analyze brain myeloid cells, we isolated CD45⁺ cells from the brain without (w/o) m/Ch preparations and m/Ch of Csf1r-EGFP mice; the gating strategy used to exclude dead cells and doublets is presented in Supporting Information, Fig. 3s. Cells of ectodermal origin, such as astrocytes, oligodendrocytes, and neurons, which together with endothelial cells constitute the majority of cells in the brain, are not labeled with CD45 antibodies. Therefore, due to the lack of specific markers for microglia itself, we used CD45 expression to characterize the proper microglia, which have a medium expression of CD45 (CD45^m), and myeloid cells from the periphery as CD45 high (CD45^h) (Carson et al., 1998; Ford et al., 1995). CD45⁺ cells accounted for 30–40% of total live cells in brain w/o m/Ch isolates (Fig. 2A, panels i–iv), and 20–30% of cells obtained from m/Ch preparations (Fig. 2B, panels i–iv). The percentage of CD45⁺ cells obtained was similar in wild type (WT) and Csf1r-EGFP mice. In isolates from Csf1r-EGFP mice, ≥96% of cells were CSF1R-EGFP⁺ CD45⁺ (Fig. 2A,B). We found few CD45⁺ EGFP⁻ cells in the brain w/o m/Ch cell isolates (Fig. 2A, panel v) and in the m/Ch preparations (Fig. 2B, panel v). To include this small CSF1R-EGFP⁻ CD45⁺ subset in our study, we used CD45 labeling instead of EGFP expression to study brain myeloid cells for subsequent analysis.

Flt3L-Dependent Accumulation of Cd45⁺ Cells in Brain

We are interested in the different myeloid cell subsets present in the steady-state brain. In this context, an increase in bDC numbers has been reported after treatment of mice with Flt3L (Greter et al., 2005; Anandasabapathy et al., 2011). The latter authors observed an increase in a CD45^hCD11c⁺MHCII⁺ cell population that was expanded after treatment of mice with Flt3L. We isolated brain myeloid

CSFR1-EGFP+ cells

A.- Isolation of cells from brain without m/Ch



B.- Isolation of cell from m/Ch

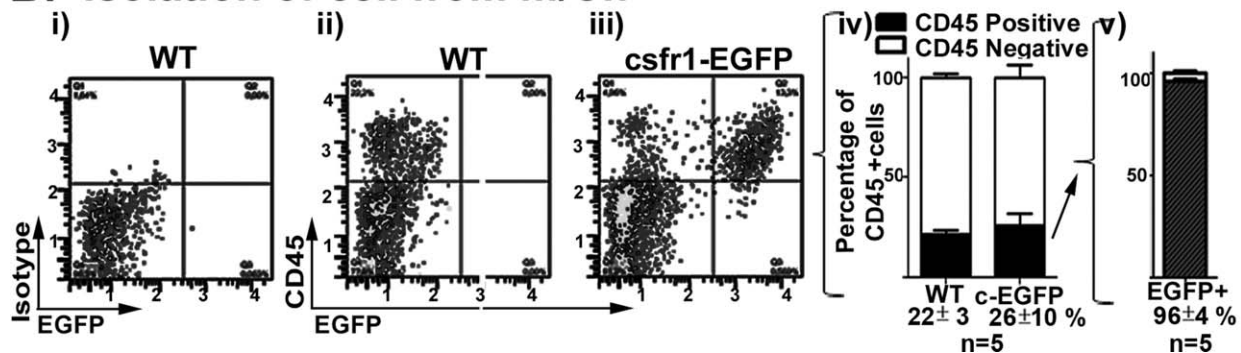


FIGURE 2: Identification of CD45-positive brain cells. Flow cytometry dot plots of live cells isolated from (A) brain except cerebellum, meningeal membranes, and choroid plexus (B) meningeal membranes and choroid plexus (m/Ch). Cells were isolated from wild type (WT) and Csf1r-EGFP mice, and stained with control isotype antibody (APC rat IgG2b; panel i) or with APC rat anti-mouse CD45 (panels ii and iii). Panels iv show the arithmetic mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of CD45⁺ (black) and CD45⁻ (white) cells isolated. Panel v represents the arithmetic mean \pm SEM ($n = 5$) of percentage of EGFP⁺ cells in the Csf1r-EGFP cell isolates. The gating strategy was as presented in Supporting Information, Fig. 3s.

cells from untreated ($-$ Flt3L) and Flt3L-treated ($+$ Flt3L) WT animals and analyzed CD45⁺ cell numbers. In brain w/o mCh preparations, we distinguished two CD45⁺ populations according to fluorescence intensity in response to FLT3L, and in accordance with published data (Carson et al., 1998), we refer to these as CD45^m (medium intensity) and CD45^h (high intensity) (Fig. 3). Flt3L treatment did not increase the percentage of total CD45⁺ cells isolated (Fig. 3A, panel I). However, Flt3L treatment did increase the frequency and numbers of cells in the CD45^h population in isolated cells from brain w/o m/Ch (Fig. 3A, panels II and 3C). The Flt3L-induced increase in the brain CD45^h subpopulation prompted us to analyze if these cells were of myeloid origin. For this analysis, we detected the marker CD11b, also known as Integrin alpha M chain (ITGAM), in an approach similar to that used in rat by Ford et al. (1995). Three subpopulations were detected in brain w/o m/Ch preparations. The largest ($69 \pm 7\%$ of CD45⁺ cells) was CD45^mCD11b⁺ (Fig.

3B); these cells correspond to brain microglia based on their medium staining with the CD45 marker and their staining with the CD11b marker. The other two subpopulations subdivide the CD45^h population according to CD11b expression: CD45^hCD11b⁺ ($15 \pm 4\%$) and CD45^hCD11b^{low} ($15 \pm 5\%$), and correspond to blood-borne cells as described by using irradiation chimeras (Ford et al., 1995).

Similar analyses were performed in m/Ch cell preparations (Fig. 4). The percentage of CD45⁺ cells was $32 \pm 6\%$ in the absence of Flt3L, increasing to $44 \pm 6\%$ upon Flt3L treatment in these brain localizations. The numbers of isolated CD45⁺ cells varied between the untreated and Flt3L-treated groups (Fig. 4A, panel I). CD45 and CD11b marker expression distinguished only two subpopulations: CD45^hCD11b⁺ ($66 \pm 2\%$) and CD45^hCD11b^{low} ($26 \pm 1\%$) (Fig. 4B). The percentage and numbers of total CD45⁺ cells obtained from m/Ch was not significantly affected by Flt3L treatment, but the relative frequency and numbers of

Analysis of CD45⁺ cells from brain without m/Ch

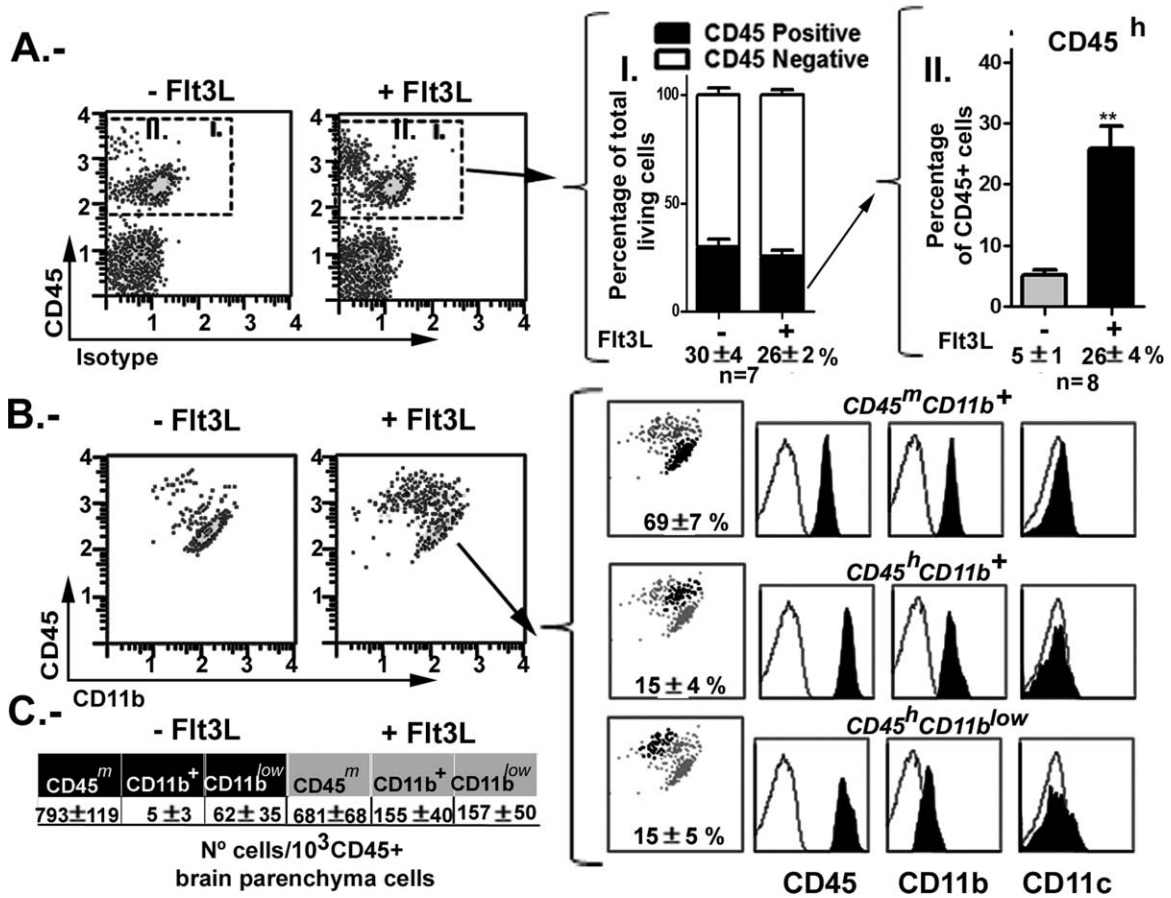


FIGURE 3: Analysis of CD45⁺ cells from brain without m/Ch of WT C57BL/6 mice treated with Flt3L. (A) Mice were untreated (–Flt3L) or injected with B16 Flt3L-secreting tumor cells (+Flt3L), and myeloid isolates from brain w/o m/Ch (14 days post injection) were stained with APC rat anti-mouse CD45. CD45⁺ cells were gated in both conditions. Bar graphs show quantification of CD45⁺ cells (black) as a percentage of total live cells in –Flt3L and +Flt3L mice. Bar graph shows the percentage of cells with high expression of CD45 (CD45^h) in –Flt3L versus +Flt3L mice. (B) Cells were doubly stained with APC rat anti-mouse CD45 together with Cy7-APC rat anti-mouse CD11b. CD45⁺CD11b⁺ brain parenchyma cells from Flt3L-treated mice can be separated into three subpopulations: CD45^mCD11b⁺; CD45^hCD11b⁺; and CD45^hCD11b^{low}. Histograms on the right show CD45, CD11b, and CD11c staining on the surface of myeloid cells from brain w/o m/Ch: white histograms represent isotype control and black histograms represent specific staining with the antibodies indicated. (C) Numbers of CD45^m, CD11b⁺, and CD11b^{low} cells isolated (no of cells/1000 CD45⁺ brain parenchyma cells). The gating strategy was as presented in Supporting Information, Fig. 3s. Representative experiments or mean ± SEM are shown of 7–8 independent experiments.

CD45^hCD11b^{low} cells was increased (Fig. 4A, panels II and 4C). The number of CD45^hCD11b^{low} cells was 82 ± 15 cells/10³ CD45⁺ cells, increasing approximately threefold to 261 ± 11 cells/10³ CD45⁺ cells in the presence of Flt3L (Fig. 4C). bDCs have been identified mainly in the m/Ch (see the section titled “Introduction”). Flt3L-responsive m/Ch cells in the brain have been reported to have a CD45^hCD11c⁺MHCII⁺ phenotype, detected mainly with the use of the CD11c-EYFP transgenic mouse (Anandasabapathy et al., 2011). Using our m/Ch brain isolation methodology, we were unable to detect CD11c⁺ cells in flow cytometry (FC) analyses, although the antibody was able to

recognize the presence of CD11c⁺ cells in the spleen (Supp. Info., Fig. 4s and the section titled “Discussion”). Since bDCs should express major histocompatibility complex class II (MHCII) antigens in their membrane, we first analyzed the expression of MHCII by immunofluorescence (IF). MHCII⁺ cells were rarely found in the BP, but when found, they were situated always in close proximity with blood vessels (Fig. 5A) and probably correspond to perivascular macrophages (see the section titled “Discussion”). MHCII⁺ cells in the Flt3L-treated mice were mainly situated in the plexus (Fig. 5B). Most of the cells analyzed showed co-localization of both markers, although we noted that stronger staining of

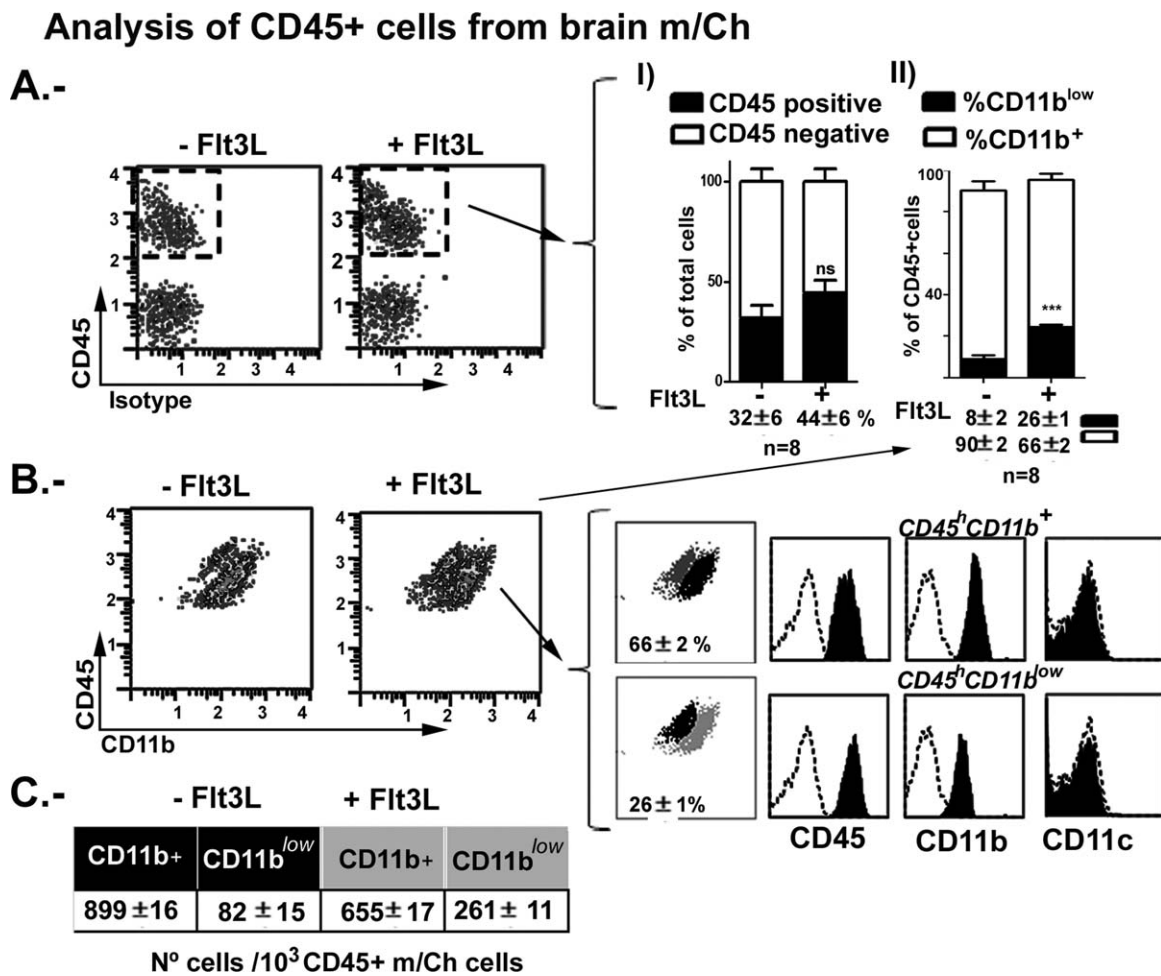


FIGURE 4: Analysis of CD45⁺ cells from meningeal membranes and choroid plexus (m/Ch) of WT C57BL/6 mice treated with Flt3L. (A) Mice were untreated (–Flt3L) or injected with B16 Flt3L-secreting tumor cells (+Flt3L), and 14-d myeloid m/Ch isolates were stained with APC rat anti-mouse CD45. CD45⁺ cells were gated in both conditions. Panel I shows quantification of CD45⁺ cells (black) as a percentage of total live cells in –Flt3L and +Flt3L mice. (B) Cells were doubly stained with APC rat anti-mouse CD45 together with Cy7-APC rat anti-mouse CD11b. CD45⁺CD11b⁺ m/Ch cells from Flt3L-treated mice can be separated into two subpopulations: CD45⁺CD11b⁺ and CD45⁺CD11b^{low}. Histograms on the right show staining on the surface of CD45, CD11b, and CD11c m/Ch myeloid cells: white histograms represent isotype control and black histograms represent specific staining with the antibodies indicated. (C) Numbers of CD45⁺, CD11b⁺, and CD11b^{low} cells isolated (no of cells/1000 CD45⁺ m/Ch cells). Bar graph II on the far right of panel A shows CD45⁺CD11b^{low} (black) and CD45⁺CD11b⁺ (white) cells as a percentage of all CD45⁺ cells isolated from –Flt3L and +Flt3L mice. The gating strategy was as presented in Supporting Information, Fig. 3s. Representative experiments are shown of 8 independent experiments, each consisting of pooled m/Ch preparations from two brains. Numerical data are presented as the mean ± SEM of 7 independent experiments.

the MHCII antigen corresponded to a less bright CSF1R-EGFP⁺ fluorescence by IF (not quantified) (Fig. 5B, panel ii). In the pia leptomeningeal membrane, most CSF1R-EGFP⁺ cells were MHCII[–] (Fig. 5C, panel i), and when MHCII⁺ cells were found, they were situated close to vessels and in clusters (Fig. 5C, panel ii inset). These MHCII⁺ cells in meningeal membrane showed a diminished EGFP fluorescence (Fig. 5C, panel ii), and were seen only in Flt3L-treated mice.

We wanted to analyze the presence of CD11c⁺ in the noninjured mice without using transgenic mice such as the CD11c-YFP (Bullock et al., 2008) or CD11c-GFP (Pro-

dinger et al., 2011). For this purpose, we analyzed Flt3L-treated animals to increase the number of these cells and used a Tyramide Signal Amplification (TSA) method in combination with our Alexa Fluor dyes to achieve high-resolution signal amplification as specified in material and method section. Following this protocol, we have been able to observe CD11c⁺ cells in the m/Ch but not in the brain itself. These CD11c⁺ cells were more numerous in the plexus, and they colocalized with MHCII staining as shown in Fig. 5D. To be able to analyze in more detail MHCII⁺ in the different brain localization, we analyzed cell suspensions isolated from brain w/o mCh (Fig. 6A) and m/Ch preparations (Fig. 6B). Cells

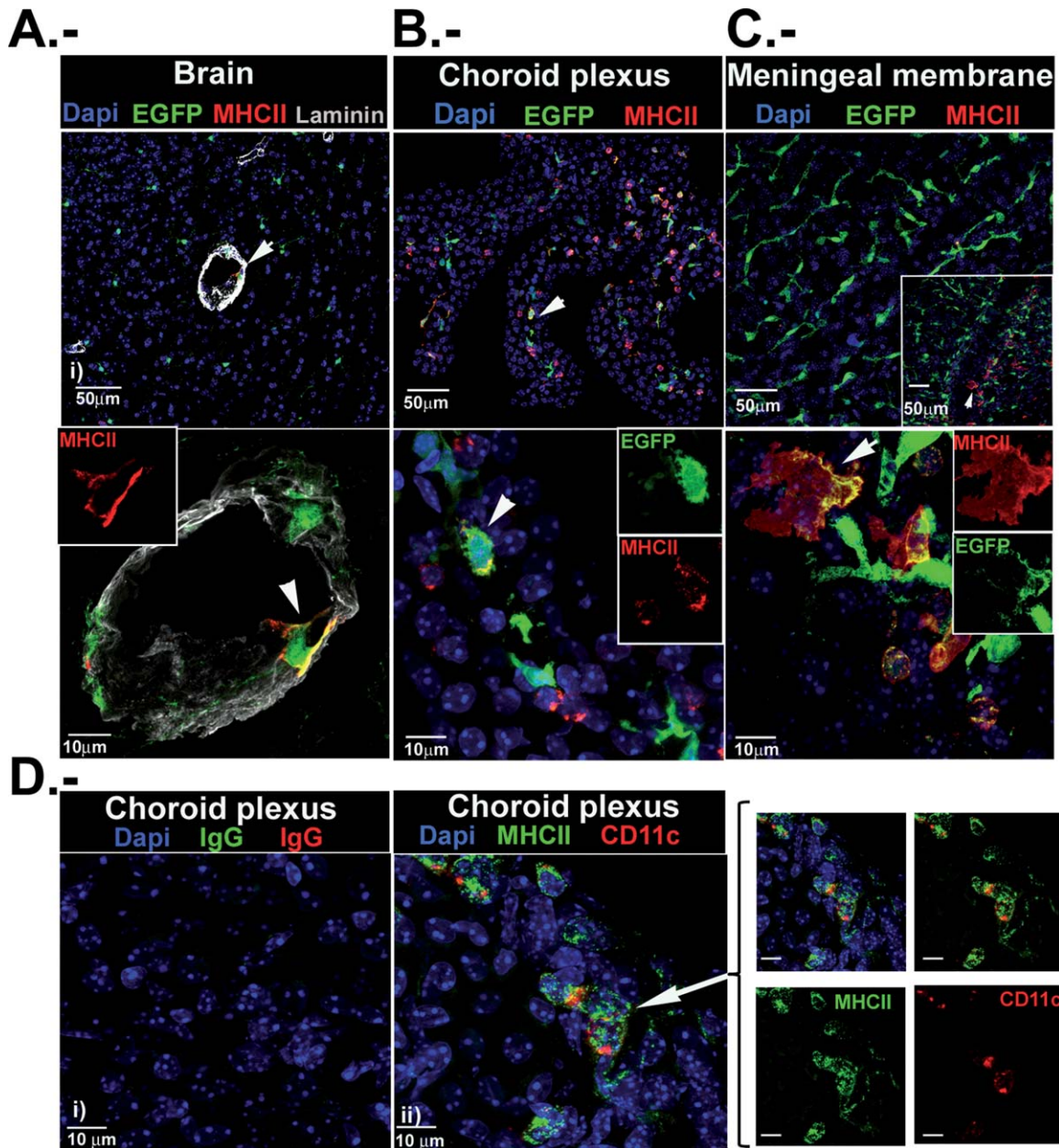


FIGURE 5: Expression of MHCII in the Flt3L-treated brain by immunofluorescence. Immunofluorescence staining of Csfr-EGFP adult brain of adult mice treated with Flt3L (+Flt3L). Thirty-micrometer cryostat coronal brain sections (A, B, and D) and 80 µm vibratome horizontal sections for meningeal membranes (C) were used. Sections were stained as follows: nuclei with Dapi (blue), microglia/macrophage visualized by direct fluorescence of Csfr-EGFP (green), antibodies to mouse MHCII (red). In panel A, blood vessels were stained with pan-laminin (white) (A, panel i) 40× scan image of parenchymal brain, arrow indicates blood vessel amplified in panel ii. 40× scan image of choroid plexus (B, panel i) and pia leptomeningeal membrane (C, panel i); inset in panel C shows accumulation of MHCII⁺ cells (red) in localized areas. Amplified areas shown in panel ii are marked with an arrow. (Panels ii) 63× amplification of the region marked (arrow) showing (A, panel ii). MHCII plus CSFR-EGFP⁺ and pan-laminin co-localization. Inset shows arrow-labelled MHCII positive cell (red). (B, panel ii) choroid plexus, insets show EGFP and MHCII staining separately. (C, panel ii), meningeal membrane, insets show EGFP and MHCII staining separately from arrow-marked cell. In panel B and C laminin staining was not shown. (D, panel i), 63× amplification of choroid plexus, shows negative control of tyramide enhanced IF method in choroid plexus. (D, panel ii), co-staining of CD11c⁺ cells (red), MHCII⁺ cells (green) and nuclei with Dapi in blue. Individual staining is shown in left panels. Images were captured with a Leica SP5 TCS confocal microscope fitted with a 40× objective or a 63× objective with 3× digital zoom.

from the brain w/o m/Ch preparations of untreated control animals (−Flt3L) had a CD45^m phenotype, and FC analysis showed that these cells were MHCII[−]. Flt3L treatment

induced MHCII expression in <1% of cells in this CD45^m subpopulation (Fig. 6A, panel I). The CD45^hCD11b⁺ population contained 36 ± 5% MHCII⁺ cells, and this percentage

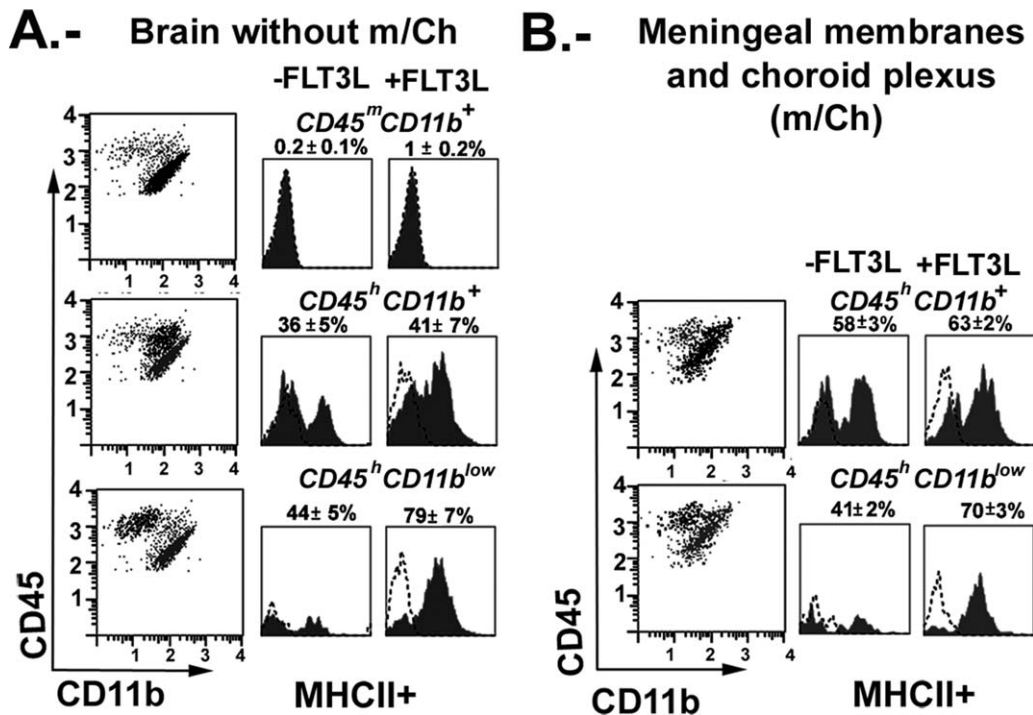


FIGURE 6: Expression of MHCII in the isolated brain cells from Flt3L-treated mouse. WT male mice were Flt3L-treated. Flow cytometry dot plots of CD45/CD11b-positive cells in brain preparations as before (A) and m/Ch (B) from -Flt3L and +Flt3L animals (details as in Figs. 3B and 4B). Histograms show results of staining for MHCII with a FITC rat anti-mouse MHCII antibody. Dotted lines represent the fluorescence of the isotype control; gray histograms represent the specific staining. The percentage of MHCII-positive cells in each population is indicated as the mean \pm SEM of 3 independent experiments.

did not vary significantly in the presence of Flt3L ($41 \pm 7\%$) (Fig. 6A, panel II). The amount of $CD45^h CD11b^{low}$ cells obtained in the noninjured brain varied between different brain preparations. The majority of these cells ($79 \pm 7\%$) expressed MHCII in their membranes (Fig. 6A, panel III). Since we did not observe MHCII⁺ cells in the parenchyma proper by IF analysis, we believe that these MHCII⁺ cells might reflect contamination by m/Ch cells or perivascular myeloid cells. Further analysis is required to assess the localization and origin of these MHCII⁺ cells in the brain parenchyma.

When m/Ch preparations were analyzed, we observed a threefold increase in the number of $CD45^h CD11b^{low}$ cells, as shown before (Fig. 4). Of the $CD45^h CD11b^{low}$ cells obtained from m/Ch, $70 \pm 3\%$ were MHCII⁺ (Fig. 6B). In conclusion, Flt3L treatment preferentially expands a $CD45^h CD11b^{low}$ subset of MHCII⁺ cells in the m/Ch. The fact that these cells are increased in the presence of Flt3L and that they have a $CD45^h CD11b^{low}$ MHCII⁺ phenotype leads us to think that they are the bDCs previously described in m/Ch (Anandasabapathy et al., 2011; McMenamin, 1999; McMenamin et al., 2003; Prodinger et al., 2011), and that we detected localized mainly in the choroid plexus (Fig. 5).

Expression of Dngr-1 Transcripts in Mouse Brain

The gene expression profile of Flt3L-responsive m/Ch myeloid cells bears strong similarities to that of the $CD8\alpha^+$ DC subpopulation in the spleen (Anandasabapathy et al., 2011). The high expression of DNDR-1 (CLEC9A) is an excellent marker of Batf3-IRF8-Id2-dependent DCs of the $CD8\alpha^+$ family (Caminschi et al., 2009; Huysamen et al., 2008; Sancho et al., 2008); reviewed in Shortman and Heath, 2010. We expanded DNDR-1⁺ DCs by treatment with Flt3L (Iborra et al. 2012) and analyzed *Dngr-1* mRNA expression in spleen (positive control) and in an array of brain structures: olfactory bulb (Ob); cerebellum (Cbl); brain cortex (Ctx); striatum (Str); meningeal membranes and choroid plexus (m/Ch); subventricular zone (SVZ) isolated as in Feron et al. (2007) and Guo et al. (2012); hippocampal formation (Hpp); and thalamus (Th). Only the m/Ch samples showed expression of all *Dngr-1* isoforms (Fig. 7A,B), similarly to the defined isoforms in the mouse spleen (Sancho et al., 2008). As a control of specificity, we used spleen and brain tissue from untreated and Flt3L-treated *Clec9a^{egfp/egfp}* mice, which lack DNDR-1, confirming no amplification of the specific *Dngr-1* transcript in these samples (data not shown).

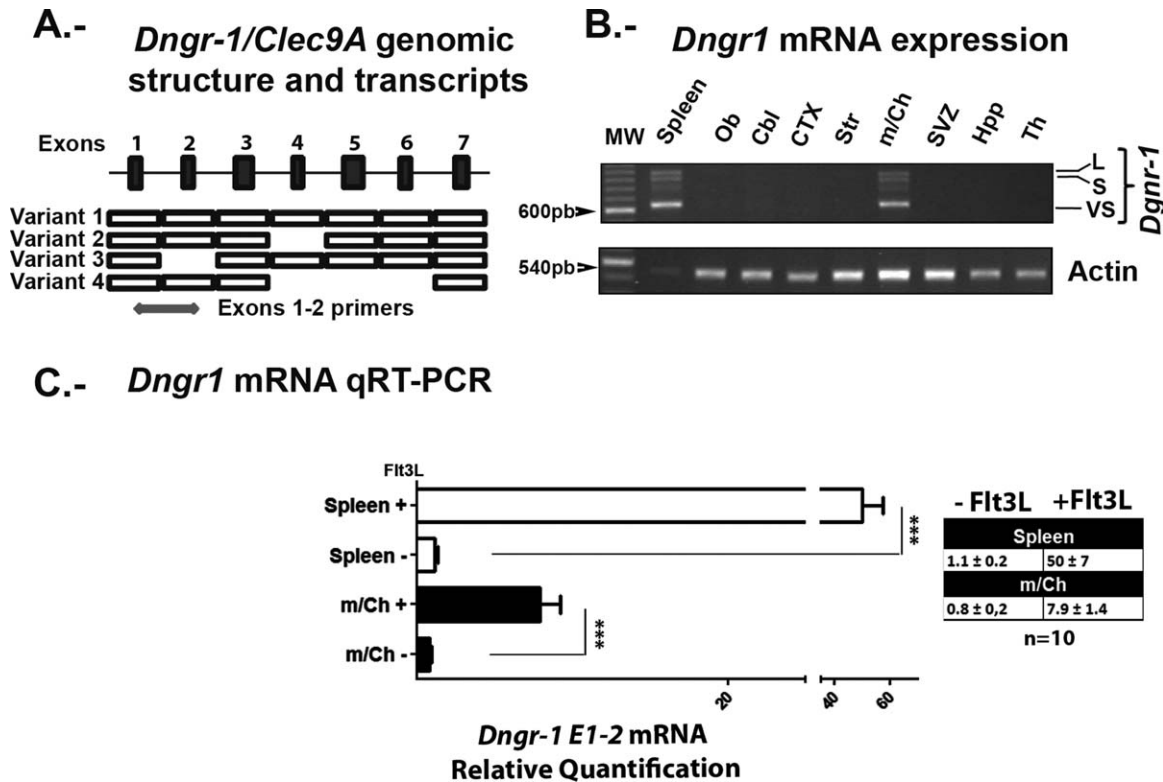


FIGURE 7: Mouse *Dngr-1/Clec9a* gene structure and expression. (A) *Dngr-1/Clec9a* gene structure, showing constituent exons and interspersing introns. The possible *Dngr-1* protein variants are depicted underneath. The region amplified by real time PCR primers is indicated. (B) Expression of *Dngr-1* mRNA in spleen and different brain tissues (Ob: olfactory bulb, Cbl: cerebellum, CTX: cortex, Str: striatum, m/Ch: meninges/choroid plexus, SVZ: subventricular zone isolated as in Ferron et al., 2007; Guo et al., 2012, Hpp: hippocampus, Th: thalamus). Samples were analyzed by RT-PCR with primers for *Dngr-1*, with β -actin as the reference gene. Samples were loaded in equal quantities, except for spleen, which was loaded at a 1/30 relative dilution in order to avoid saturation due to the high expression in this tissue. Base-pair lengths of specific *Dngr-1* bands are indicated as follows: L corresponds to *Dngr-1* variant 1 (996 pb), S corresponds to variants 2 and 3 (918 and 915 pb), and VS to variant 4 (647 pb). (C) Mouse *Dngr-1* mRNA expression in spleen, m/Ch and brain preparations of untreated (–) and Flt3L-treated (+) animals. *Dngr-1* specific mRNA was amplified from total mRNA using SYBR Green Real-time PCR methodology; the reference sample was spleen from untreated animals and the reference gene was 36B4. ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$ for untreated (–) samples versus Flt3L-treated (+) samples ($n = 10$).

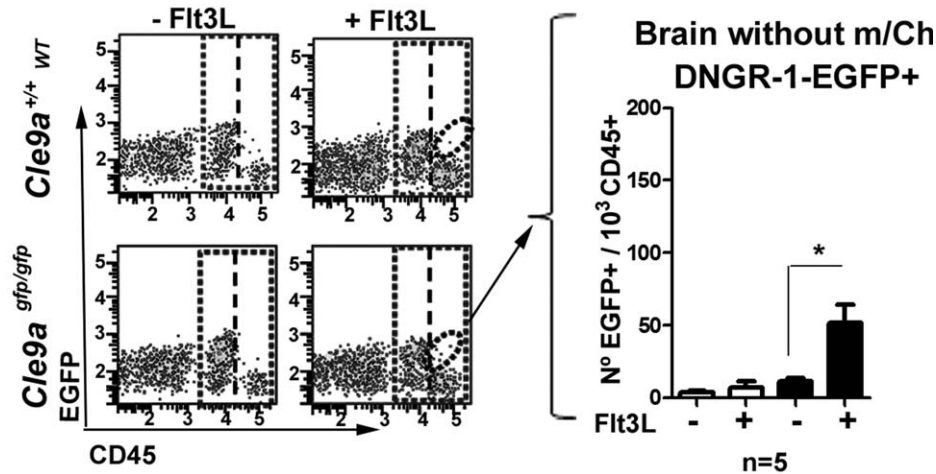
Selective expression of *Dngr-1* in m/Ch of Flt3L-treated animals was corroborated by real-time PCR. The higher sensitivity of this technique allowed detection of *Dngr-1* transcripts in the brain w/o m/Ch preparations, but in lower amounts than in m/Ch. Flt3L strongly augmented the amount of *Dngr-1* transcript in splenocytes and m/Ch preparations, with the expression of *Dngr-1* in Flt3L-treated splenocytes around 5 times higher than in m/Ch cell preparations (Fig. 7C). This Flt3L-triggered increase in the expression of *Dngr-1* is consistent with the increase in the percentage of CD45^h cells induced by the same cytokine (Figs. 3 and 4). Together, these results show that Flt3L induces *Dngr-1* expression preferentially in the m/Ch.

The procedures for isolating cell populations from the adult brain expose cells to enzymes and mechanical forces that can damage membranes or membranes molecules. Some of these enzymatic procedures could cleave specific membrane cellular markers of interest such as DNGR-1, leading to false-

negative results in the FC analysis. To circumvent this problem, we used *Clec9a*^{egfp/egfp} mice (Sancho et al., 2009), which express a farnesylated form of EGFP in frame with the first two aminoacids of DNGR-1. Thus, expression of EGFP marks DNGR-1-expressing cells, and is restricted in the spleen to CD8 α ⁺ cDC cells (Sancho et al., 2009). Accordingly, Flt3L treatment induced a 10-fold expansion of EGFP⁺ DCs in the spleen (Supp. Info., Fig. 3s). Cytometry analysis of brain w/o m/Ch and m/Ch cells isolated from \pm Flt3L-treated WT and *Clec9a*^{egfp/egfp} mice revealed EGFP expression in CD45^h cells in both cell preparations. In brain w/o m/Ch preparations, there was a modest but significant increase in the numbers of CD45^h EGFP⁺ cells (Fig. 8A), whereas in m/Ch preparations, the CD45^h EGFP⁺ cells were increased 10-fold by Flt3L treatment (Fig. 8B).

We next analyzed the expression of MHCII antigen in EGFP⁺ cells. As a positive control, we analyzed the Flt3L-induced increase in EGFP⁺ splenocytes, finding that all

A.- Brain without m/Ch



B.- m/Ch

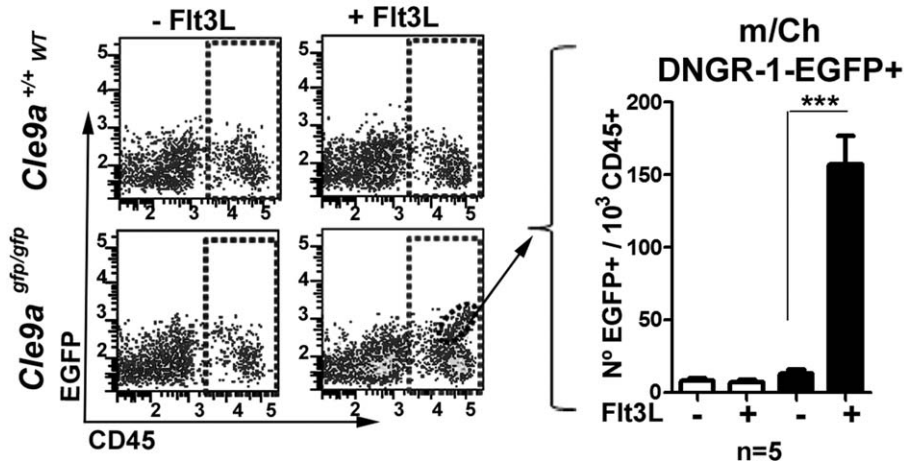


FIGURE 8: DNDR-1-EGFP⁺ cells in brain cell isolates. Myeloid cells were analyzed from the brain as before (A) and m/Ch (B) of *Cle9a*^{+/+} wt and *Cle9a*^{gfp/gfp} littermates that were untreated (–Flt3L) or treated with Flt3L (+Flt3L) for 14 days. Flow cytometry dot plots show staining with APC rat anti-mouse CD45 antibody from a representative experiment of 5 performed. Gates are shown corresponding to total CD45⁺ cells (dotted line) and CD45⁺ cells with high intensity (CD45^h; dashed line). The oval regions demark the population of CD45^h DNDR-1-EGFP⁺ cells. Bar charts in A and B show numbers of CD45^h DNDR-1-EGFP⁺ cells per 10³ CD45⁺ cells from control (–Flt3L) and treated (+Flt3L) animals. Data are mean ± SEM of 5 independent experiments. To obtain sufficient cell numbers, m/Ch isolates from two brains were pooled for each condition.

CD45⁺ DNDR-1-EGFP⁺ cells in the spleen were MHCII⁺ (Supp. Info., Fig. 4s, panel B). Analysis of brain w/o m/Ch and m/Ch isolates showed that DNDR-1-EGFP⁺ cells were also MHCII⁺ in the brain by FC analysis (Fig. 9A,B). EGFP⁺ cells have low expression of CD11b, and correspond to the CD45^hCD11b^{low} subpopulation described in Figs. 3 and 4. Since MHCII⁺ cells in Flt3L-treated animals are situated mainly in the choroid plexus (Fig. 5), we analyzed if the DNDR-1-EGFP⁺ cells were positive for CD11c and MHCII, both known DC markers (see the section titled “Introduction”). DNDR-1-EGFP⁺ cells were localized mainly

in the plexus and were detected by a weak direct fluorescence of EGFP protein. These DNDR-1-EGFP⁺ cells co-expressed the MHCII and CD11c markers (Fig. 9C). These findings thus establish the existence of a subset of CD11c⁺ MHCII⁺ cells that express DNDR-1 in the brain. Our conclusion is that DNDR-1 expression allows for further discrimination of DC subsets in the brain.

The surface protein and mRNA expression analyses performed here indicate that the majority of Flt3L-dependent cells in the brain are located in the m/Ch. To confirm the DC-nature of the Flt3L-dependent cell population in the

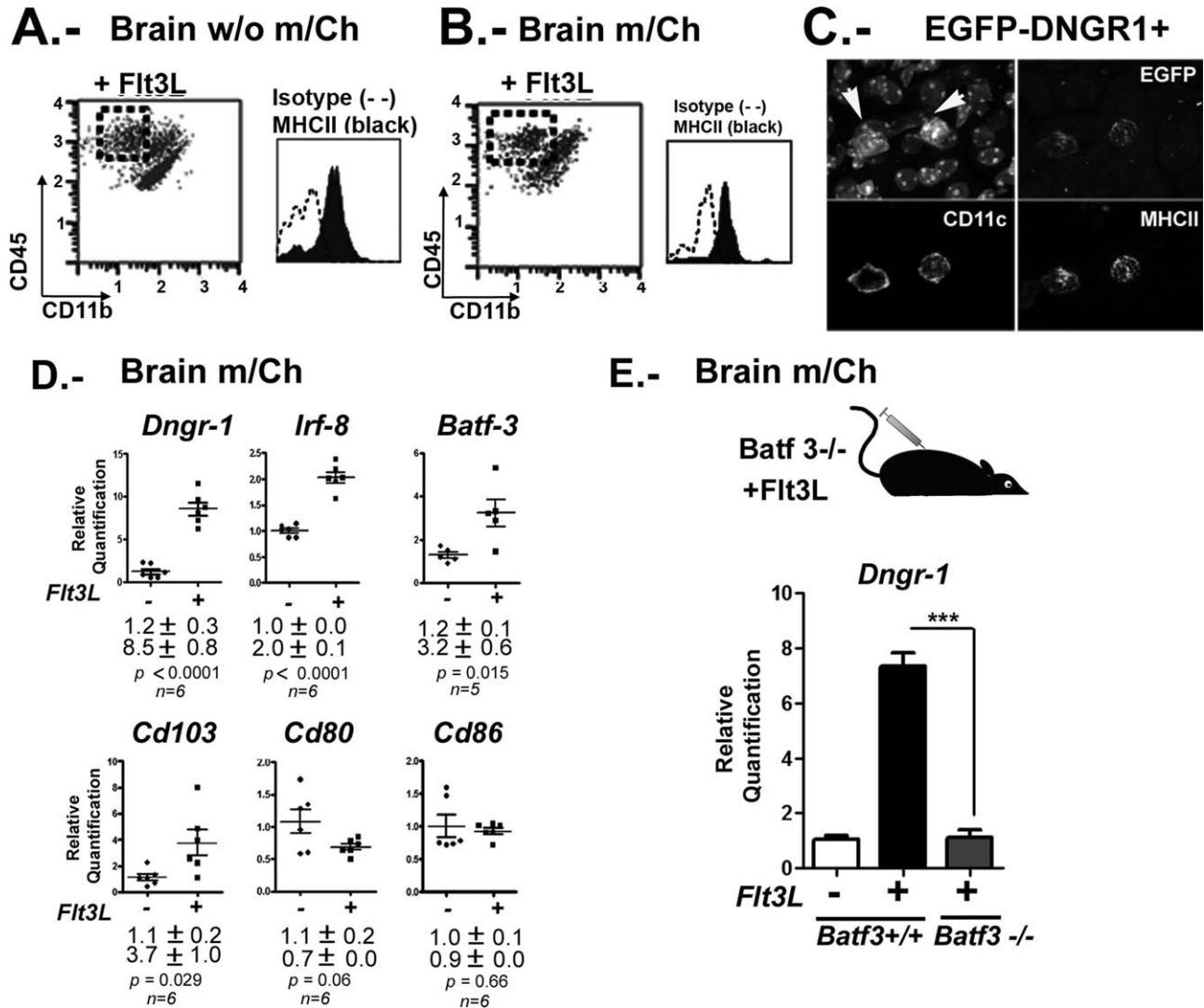


FIGURE 9: MHCII expression in DNDR-1-EGFP⁺ brain cells. Flow cytometry dot plots of (A) myeloid (CD45⁺) brain cells, and (B) CD45⁺ m/Ch cells from Flt3L-treated *Cle9a^{egfp/egfp}* mice. Cells were labeled with the following antibodies: PE-Cy7 rat anti-mouse CD45, Cy7-APC rat anti-mouse CD11b, and APC rat anti-mouse MHCII (IA-IE). DNDR-1-EGFP⁺ cells correspond to the CD45⁺CD11b^{low} subpopulation in isolates from brain w/o m/Ch (A) and m/Ch (B) (dotted line). Histograms show MHCII staining on the surface of CD45⁺CD11b^{low} DNDR-1-EGFP⁺ cells in Flt3L-treated animals. Data are representative of three independent experiments performed. (C) IF analyses from Flt3L-treated *Cle9a^{egfp/egfp}* mice choroid plexus; coronal brain sections were visualized by direct fluorescence of EGFP, and stained with antibodies to CD11c (Cy3 Tyramide) and MHCII (647 anti-rat). We show split channels of DNDR-1-EGFP⁺ cells marked with arrows. (D) RT-PCR analysis of *Dngr-1*, *Batf-3*, *Irf-8*, *Cd103*, *Cd80*, and *Cd86* mRNA expression in m/Ch from control (-Flt3L) and treated (+Flt3L) mice. *** $p < 0.001$ or ** $p < 0.01$ with respect to m/Ch from control animals (n = 6). (E) *Batf-3^{+/+}* (WT) and *Batf-3^{-/-}* mice littermates that were untreated (-Flt3L) or treated with Flt3L (+Flt3L) for 14 days. m/Ch isolated as before and *Dngr-1* specific mRNA was amplified from total mRNA using SYBR Green Real-time PCR methodology; the reference sample was m/Ch from untreated animals and the reference gene was 36B4. ** $P \leq 0.01$; for untreated (-) samples versus Flt3L-treated (+) samples of n = 4.

m/Ch, we analyzed the mRNA expression of DC molecular markers typical of DNDR-1⁺ DCs (Poulin et al., 2010; Poulin et al., 2012) by quantitative RT-PCR. Choroid plexus from Flt3L-treated mice showed increased mRNA expression of the transcription factors *Irf-8* (interferon regulatory factor 8) and *Batf-3* (basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3) (Fig. 9E). We also detected increased expression of *Cd103* (integrin alpha E (ITGAE)), a molecule expressed in dendritic cells from nonlymphoid tissues (reviewed in del Rio

et al., 2010). In contrast, mRNAs encoding the co-stimulatory molecules *Cd40* (data not shown), *Cd80*, and *Cd86* were not increased after Flt3L treatment, consistent with nonactivated state of these DCs in the normal brain. These results thus indicate that Flt3L-treated m/Ch show increases in the expression of genes that specifically mark the splenic CD8α⁺ DC and peripheral CD103⁺ DC subsets, and therefore, the bDCs described here share similarities with this specific DC subset.

Deletion of the transcription factor Batf3 has been shown to ablate development of CD8 α^+ DCs in the periphery (Hildner et al., 2008). We therefore predicted that the m/Ch of mice lacking this transcription factor (Batf3 $^{-/-}$) would be defective for Flt3L accumulation. Flt3L-treated Batf3 $^{-/-}$ animals did not show increases in *Dngr-1* mRNA when compared with similarly-treated wild-type littermates (Fig 9E). This implies that Flt3L-induced DNDR-1-EGFP $^+$ CD11c $^+$ MHCII $^+$ cells in the brain are very similar and have the same requirements as their peripheral CD8 α^+ DC counterparts. The exact role of these cells in the intact and injured brain remains to be defined.

Discussion

In this study, we have shown Flt3L-dependent accumulation of a population of DNDR-1(CLEC9A)-EGFP $^+$ CD45 h CD11b low MHCII $^+$ myeloid cells in the brain. These cells accumulate mainly in the m/Ch that surrounds the brain. We call these cells m/Ch DCs, as has been proposed before (Anandasabapathy et al., 2011). These cells have been shown to share functional and developmental characteristics with CD8 α^+ cDCs from spleen, and here we show that m/Ch DCs express the C-type lectin receptor DNDR-1/CLEC9A.

The entry and activation of T cells in the brain parenchyma requires a pre-existing interaction of these cells with APCs. Most cells in the body can present antigen to CD8 α^+ T cells via MHC class I molecules, and thus act as APCs. However, the term APC is often reserved for specialized cells that can prime CD8 $^+$ (cytotoxic) T cells through MHC class I molecules and also stimulate CD4 $^+$ (helper) T cells through MHC class II. APCs that express MHC class II molecules are often called professional APCs, and mainly consist of macrophages and dendritic cells. To isolate brain myeloid cells which express MHCII in their membranes, and therefore can function as professional APCs in the brain, we made use of Csf1r-EGFP mice (Figs. 1 and 2), which express EGFP protein under the control of the CSF1R/CD115/*fms* promoter (Sasmono et al., 2003). CSF1R plays an important role in the development and maintenance of brain microglia (Elmore et al., 2014; Erlich et al., 2011), and our data show the existence of morphologically distinct CSF1R-EGFP $^+$ cells in BP and m/Ch of Csf1r-EGFP mice (Fig. 1). We are aware that brain parenchymal cells should refer only to the proper microglial cells (CD45 med). Therefore, we have tried to avoid using the term BP referring to myeloid cells isolated from brain without m/Ch, which contains perivascular macrophages with expected different functions. The presence of differences in the CSF1R-EGFP $^+$ cells within the distinct brain areas are in line with previously described results showing myeloid cells from noninjured rat and mouse brains, identified with an array of different antibodies and methods (Bul-

loch et al., 2008; Matyszak and Perry, 1996; McMenamin, 1999; McMenamin et al., 2003; Prodinger et al., 2011). The use of a well-known marker for brain microglia cells such as Iba-1 showed that in the brain tissue, this cellular marker co-localizes with CSF1R-EGFP $^+$ in the IF analyses (Supp. Info., Fig. 2s). These results show that CSF1R-EGFP transgenic mice reproduce the morphological difference between the distinct myeloid cells existing in the brain. We could detect two different myeloid cells in the brain: the microglia proper, with small soma and long prolongations as described in the literature (see the section titled "Introduction"), and more amoeboid cells in close proximity to the vessels, which might correspond to perivascular macrophages, as observed before (Prodinger et al., 2011). Although these authors reported a population of CD11c-GFP $^+$ cells in this location, we could not observe CD11c $^+$ cells by IF analysis. Most of the CSF1R-EGFP $^+$ cells isolated from noninjured brain w/o m/Ch showed moderate expression of CD45 (CD45 med), with very few CD45 h expressing cells, a finding in accord with the low frequency of infiltration by peripheral leukocytes in the healthy brain (Ginhoux et al., 2009; Mildner et al., 2007). Our isolation methods are based on those described by other authors (Carson et al., 1998; Ford et al., 1995), and in agreement with their data, our isolation procedure with long perfusion of the brains before isolation eliminates most of the CD45 h cells from the brain preparations once we have dissected out the m/Ch. It is still possible that this isolation method does not efficiently extract these perivascular cells, and that we are therefore not evaluating the exact number of these CD45 h cells in the FC analysis. Further work will be required to clarify the number of CD45 h cells residing in the perivascular space and determine to what extent they are induced by Flt3L.

In cells obtained from the m/Ch, 4 \pm 3% of isolated CD45 $^+$ cells were CSF1R-EGFP $^-$ by FC. These cells are of myeloid origin, since they were labeled with anti-CD11b antibody. The use of the Csf1r-EGFP mice together with IF with other well-known myeloid markers reveals the complexity of the myeloid cells in the brain. We observed a variation in the intensity of CSF1R-EGFP $^+$ staining, and since 7 \pm 2% of the CSF1R-EGFP $^+$ cells we detected were Iba1 $^{low/-}$ in the m/Ch preparations, this suggests that different myeloid cells coexist in the normal brain. As yet we do not know the exact origin of these cells, or if they differ functionally from the CSF1R-EGFP $^+$ Iba1 $^+$ cells. CSF1R-EGFP $^+$ Iba1 $^-$ cells were very prominent in the meningeal membrane, and future studies will need to analyze the choroid plexus and meningeal membrane separately. We are currently studying how these cell populations change in response to neuroinflammatory challenges. So far, our data suggest that more than one myeloid-specific marker might be required to give a

clear picture of the number and complexity of myeloid cells in the brain, particularly in the brain membranes and choroid plexus, and that analyses by cell suspension FC and IF will be required.

Flt3L treatment did not increase the numbers of CSF1R-EGFP⁺ cells in brain isolates or m/Ch compartments (data not shown). This finding is in accordance with previous data showing that Flt3L-responsive m/Ch DCs express the Flt3L receptor but not the CSF1R/CD115 receptor on their cell surface (Anandasabapathy et al., 2011). Our data show that, while the Csflr-EGFP mouse is a good model for visualizing microglia cells in the brain, there is a subset of myeloid cells that we might be overlooking. For this reason, we carried out most of our brain myeloid analysis on CD45⁺ cells, distinguishing the CD45^m resident microglia cells in the BP from CD45^h myeloid cells of peripheral origin. Although we did not confirm this observation in mouse-chimera experiments, this distinction between resident and peripheral-origin CD45⁺ cells in the brain has been observed by many studies of microglia and peripheral infiltrating brain macrophages (Anandasabapathy et al., 2011; Ford et al., 1995).

These results raise the question of whether these Flt3L-dependent cells are true dendritic cells. The existence of brain parenchymal dendritic cells in the normal brain is still debated, although cells with DC markers have been found in various CNS locations (Matyszak et al., 1992; Matyszak and Perry, 1996; McMenamin, 1999; McMenamin et al., 2003). More recently, the presence of CD11c⁺ cells have been described through the use of transgenic mice such as the CD11c-enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) model, which was constructed to identify dendritic cells in the periphery (Lindquist et al., 2004), and in CD11c-GFP mice (Jung et al., 2002). The analysis of these transgenic mice showed CD11c-fluorescent cells residing mainly in the m/Ch, the perivascular spaces and juxtavascular parenchyma, with the entire population of CD11c-EYFP⁺ cells co-expressing Iba1 and MHCII in the steady-state brain parenchyma (Anandasabapathy et al., 2011; Bulloch et al., 2008; Proding et al., 2011). Previous work has shown the presence of MHCII⁺ cells in the m/Ch but not in BP from noninjured rat and mice brain by IF analysis (Matyszak and Perry, 1996), in line with our results. Many more studies have described an increase in these MHCII⁺ cells under neuroinflammatory conditions (Lv et al., 2011; Proding et al., 2011; Greter et al., 2005). Our analysis of the noninjured brain shows clear expression of MHCII⁺ cells in m/Ch, and we expected that these cells would express CD11c. In their study, Bulloch et al. discuss the difficulty in identifying CD11c protein in young, steady-state brains with the antibodies available, which were found to be unreliable and give inconsistent results in confocal microscopy analyses. These results are in line with previous reports (Fischer and Reichmann,

2001; Greter et al., 2005; Karman et al., 2006; Matyszak and Perry, 1996; McMenamin, 1999) in which DCs were detected with the same antibodies in the setting of neuroinflammation but very rarely in the noninjured brain (reviewed in (Pashenkov et al., 2003; Ransohoff and Engelhardt, 2012)). The use of transgenic mice such as CD11c-YFP and CD11c-EGFP has been very useful to visualize CD11c⁺ cells in noninjured mice, although the use of DT in CD11c-DTR-GFP mice did not exclusively lead to depletion of DCs, but also targeted macrophages in various tissues (Probst et al., 2005; van Rijt et al., 2005). Here, we used a tyramide-based method to enhance positive staining with the CD11c antibody. CD11c⁺ cells in the noninjured brain were studied in Flt3L-treated mice, and were found mainly in the choroid plexus. Using these methods, we clearly show the presence of CD11c⁺ cells in the undamaged brain, although the combined use of other molecular markers such as MHCII might provide a way to detect more accurately the presence of myeloid cells with a potential role as APCs. As we show in the nondiseased brain (Fig. 5), MHCII⁺ cells are present mainly in the brain choroid plexus in our brain preparations, although Flt3L induced the presence of MHCII⁺ in the meningeal membrane close to blood vessels (Fig. 5C). In accordance with previous published work in rat brain (Matyszak et al., 1992; McMenamin, 1999; McMenamin et al., 2003), MHCII⁺ cells are very prominent in the brain membranes, mainly in the choroid plexus, but very rare in the BP. We detected some but not many MHCII⁺ cells near the vessels, in close proximity to the basement membrane (Fig. 5A and Supp. Info., Fig. 5s), but were unable to detect CD11c⁺ cells in the perivascular or juxtavascular area as shown in Proding et al., 2011. High background around bigger vessels in the brain parenchyma made it difficult to visualize CD11c⁺ cells in this brain localization (data not shown). We did not observe this background around vessels in m/Ch preparations (Fig. 5).

As we mentioned before, we have thoroughly tried to analyze the presence of this marker in our preparation by FC analyses, without success. Our failure to detect CD11c by FC analysis might be explained in part by the susceptibility of membrane markers to digestion with the proteases used in the cell preparation protocol. Very recently (Immig et al., 2015), a very weak CD11c staining of brain myeloid cells has been shown by FC; these authors obtained their brain preparation without proteases, and this technique should be taken into account in future FC analysis of CD11c⁺ cells in the uninjured brain.

The results presented here were generated in the noninjured mouse brain, with no neuroinflammatory trigger. In line with the literature (Carson et al., 1998), our data indicate that brain w/o m/Ch preparations contain a low percentage of CD45^h cells in this condition. Nevertheless, we

consistently observed that Flt3L treatment increased the number of CD45^h cells in these preparations (Fig. 3), which contains few MHCII cells (Fig. 5). Our IF analysis with anti-MHCII antibodies barely detected any MHCII⁺ cells in the brain parenchyma itself (Fig. 5), and those that were present were situated in contact with blood vessels (Fig. 5A). In this context, Iming et al., 2015 show a lack of MHCII staining in their CD11c-positive microglia cells. Our CD11c analyses by IF did not show any CD11c⁺ cell in the parenchyma when the CD11c⁺ cells in the m/Ch were neatly observed. It is still possible that since the mean of fluorescence (MFI) in microglia is lower that might well be below the detection threshold of the technique used in these studies.

At present, we cannot discard the possibility that the Flt3L-enhanced presence of CD45^h MHCII⁺ brain cells preparations in the FC analysis might reflect contamination by m/Ch membrane cells. In m/Ch, we observed a Flt3L-triggered increase in the percentage of CD45^h CD11b^{low} MHCII⁺ cells, which corresponded to the number of MHCII⁺ cells observed by IF (Figs 5 and 6). Our findings are thus in accordance with previous data indicating the absence of MHCII⁺ cells in the BP proper of the non-diseased young brain and their localization in the m/Ch (Greter et al., 2005; Lv et al., 2011; Proding et al., 2011; Puntener et al., 2012). Further combined analysis by FC and IF with an array of different cellular markers will shed new light on the phenotype, activation stage and role of brain myeloid cells in the response to diverse neuroinflammatory stimuli.

There is an emerging role for DNNGR-1⁺ cells in the induction of T cytotoxic cell responses to cancer, viruses, and other pathogenic infections. In the brain, Piva et al. reported that depletion of DNNGR-1-positive cells decreases the number of CD8⁺ T cells in the brain after induction of experimental cerebral malaria (Piva et al., 2012). Here, we have shown a clear accumulation of DNNGR-1-EGFP⁺ cells in the Flt3L-treated m/Ch (Fig. 8). Moreover, these cells are enriched in *Dnng-1* mRNA, (Fig. 7) and there is a parallel increase in the numbers of MHCII⁺ cells (Figs. 6 and 8). We also observed a very dull fluorescence of DNNGR-1-EGFP⁺ cells in the m/Ch, but not in brain w/o m/Ch preparations (data not shown). In fact, we could not clarify whether DNNGR-1⁺ cells are present in the BP itself. On one hand, RT-PCR analysis detected a weak but significant increase in *Dnng-1* mRNA expression in response to Flt3L (data not shown) and an increase in the number of Flt3L-dependent DNNGR-1-EGFP⁺ cells in the BP (Fig. 8A). On the other hand, our immunofluorescence analysis did not detect MHCII⁺ cells in the BP. Therefore, it seems likely that the DNNGR-1-EGFP⁺ and MHCII⁺ cells detected by FC in brain w/o m/Ch preparations reflect contamination by membrane structures during dissection.

The relationship between mouse CD8 α ⁺ DCs from lymphoid tissues and mouse CD103⁺CD11b^{low}DCs from nonlymphoid tissues has been established (Ginhoux et al., 2009). These cells and their human counterparts all express the DNNGR-1 receptor (Poulin et al., 2012). CD8 α ⁺ peripheral DCs have been implicated in the homeostatic maintenance of immune tolerance and the prevention of autoimmune disease. Furthermore, in spleen, CD8 α ⁺ DNNGR-1/CLEC9A DCs share with other DCs the ability to process and present antigens in the context of MHC class II, but are more efficient in the phagocytic uptake of dead cells (Inaba et al., 1998; Iyoda and Inaba, 2002; Schulz and Reis e Sousa, 2002). Indeed, DNNGR-1 has been identified as a receptor able to recognize cell-death antigens and is a dedicated receptor for cross-presentation of cell-associated antigens (Pooley et al., 2001; Zelenay et al., 2012). Characterizing the exact role of these cells accumulating in the brain in the presence of Flt3L will be an interesting subject to pursue in the coming years.

Our results support a dendritic-like nature for Flt3L-dependent cells in the brain. First, they are responsive to Flt3L, a cytokine that has been shown to increase the dendritic repertoire. Second, they express DNNGR-1, indicated by examination of *Cle9a^{egfp/egfp}* mice and the expression of *Dnng-1* mRNA. Finally, they express the transcription factors Batf-3 and Irf-8, both of which are required for the maturation of CD8 α ⁺ classical DCs (Murphy, 2013). Although the presence of MHCII on the membrane is a requisite for antigen presentation, it is not sufficient to obtain a full T cell activation. CD80 and CD86 are costimulatory molecules that have an important role for antigen presentation to T-cells. In presence of Flt3L, we have not observed an increase in the mRNA levels of these molecules in the mCh despite the Flt3L-dependent increase in MHCII⁺ cells (Fig 9B). Therefore, our data so far do not clarify whether these cells are efficient in their role as antigen-presenting cells or if extra signals are required to achieve a mature DC phenotype. Since we have not observed an increase in the costimulatory molecules, we hypothesize that these cells do not efficiently activate T cells, and that an extra neuroinflammatory signal is required. We are currently analyzing what signals are required to obtain a full immune response in these cells.

The existence, regulation, and role of APCs in the brain DCs has implications for the development of strategies to target cargoes to these m/Ch brain DCs using receptor-specific antibodies. The expression of the highly specific receptor DNNGR-1 in these cells makes such strategies especially attractive. The similarity of these cells to lymphoid CD8 α ⁺DNNGR-1⁺ cells suggests that they might be responsible for producing efficient CTL responses (Caminschi et al., 2008; Sancho et al., 2008), and therefore could be an important target in brain disorders

such as neuroinflammation-based neurodegenerative diseases, microbe-induced encephalitis, and brain tumors such as gliomas.

Acknowledgment

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Spain; Grant numbers: PI09/0218 and PI12/0238; Grant sponsor: Red Temática Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC); Grant number: RD12/0036/0027

We thank David Hume (The Roslin Institute, University of Edinburgh) for providing the c-fms/Csflr EGFP mice. Batf-3^{-/-} was kindly provided by Dr. Kenneth M. Murphy, Washington University, St. Louis, MO, USA. We thank Amanda Sierra (Universidad del País Vasco) for her scientific discussions. Simon Bartlett (CNIC) provided English editing.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. 2007. *Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.* Nat Neurosci 10:1538–1543.
- Anandasabapathy N, Vitorica GD, Meredith M, Feder R, Dong B, Kluger C, Yao K, Dustin ML, Nussenzweig MC, Steinman RM, Liu K. 2011. *Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain.* J Exp Med 208:1695–1705.
- Axtell RC, Steinman L. 2009. *Gaining entry to an uninfamed brain.* Nat Immunol 10:453–455.
- Bullock K, Miller MM, Gal-Toth J, Milner TA, Gottfried-Blackmore A, Waters EM, Kaunzner UW, Liu K, Lindquist R, Nussenzweig MC, Steinman RM, McEwen BS. 2008. *CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain.* J Comp Neurol 508:687–710.
- Caminschi I, Lahoud MH, Shortman K. 2009. *Enhancing immune responses by targeting antigen to DC.* Eur J Immunol 39:931–938.
- Caminschi I, Proietto AL, Ahmet F, Kitsoulis S, Shin TJ, Lo JC, Rizzitelli A, Wu L, Vremec D, van Dommelen SL, Campbell IK, Maraskovsky E, Braley H, Davey GM, Mottram P, van d,V, Jensen K, Lew AM, Wright MD, Heath WR, Shortman K, Lahoud MH. 2008. *The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement.* Blood 112:3264–3273.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. 1998. *Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells.* Glia 22:72–85.
- D'Agostino PM, Gottfried-Blackmore A, Anandasabapathy N, Bullock K. 2012. *Brain dendritic cells: biology and pathology.* Acta Neuropathol 124: 599–614.
- del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Forster R. 2010. *Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells.* Immunol Rev 234:268–281.
- Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN. 2014. *Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain.* Neuron 82:380–397.
- Engelhardt B, Ransohoff RM. 2005. *The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms.* Trends Immunol 26:485–495.

- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. 2011. *Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits.* PLoS One 6:e26317.
- Ferron SR, Andreu-Agullo C, Mira H, Sanchez P, Marques-Torres MA, Farinas I. 2007. *A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells.* Nat Protoc 2:849–859.
- Fischer HG, Reichmann G. 2001. *Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation.* J Immunol 166:2717–2726.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. 1995. *Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared.* J Immunol 154:4309–4321.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. 2007. *What is immune privilege (not)?* Trends Immunol 28:12–18.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages.* Science 330:841–845.
- Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, Price J, Yin N, Bromberg J, Lira SA, Stanley ER, Nussenzweig M, Merad M. 2009. *The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs.* J Exp Med 206:3115–3130.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B. 2005. *Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis.* Nat Med 11:328–334.
- Guo W, Patzlafl NE, Jobe EM, Zhao X. *Microdissection of the SVZ and the DG of a single adult mouse. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse.* Nature Protocols 7, 2005–2012 (2012).
- Heath WR, Carbone FR. 2009. *Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces.* Nat Immunol 10:1237–1244.
- Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM. 2008. *Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity.* Science 322:1097–1100.
- Huysamen C, Brown GD. 2009. *The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors.* FEMS Microbiol Lett 290:121–128.
- Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM, Brown GD. 2008. *CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes.* J Biol Chem 283:16693–16701.
- Iborra S, Izquierdo HM, Martinez-Lopez M, Blanco-Menendez N, Reis e Sousa, Sancho D. 2012. *The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice.* J Clin Invest 122:1628–1643.
- Immig K, Gericke M, Menzel F, Merz F, Krueger M, Schiefenhevel F, Losche A, Jager K, Hanisch UK, Biber K, Bechmann I. 2015. *CD11c-positive cells from brain, spleen, lung, and liver exhibit site-specific immune phenotypes and plastically adapt to new environments.* Glia 63:611–625.
- Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM. 1998. *Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells.* J Exp Med 188:2163–2173.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuchi Y, Kohsaka S. 1998. *Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.* Brain Res Mol Brain Res 57:1–9.
- Iyoda T, Inaba K. 2002. *[Immune regulation by dendritic cells].* Tanpakushitsu Kakusan Koso 47:2133–2138.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los SK, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. 2002. *In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens.* Immunity 17:211–220.

- Karman J, Chu HH, Co DO, Seroogy CM, Sandor M, Fabry Z. 2006. *Dendritic cells amplify T cell-mediated immune responses in the central nervous system*. J Immunol 177:7750–7760.
- Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, Nussenzweig MC. 2004. *Visualizing dendritic cell networks in vivo*. Nat Immunol 5:1243–1250.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods 25:402–408.
- Lv M, Liu Y, Zhang J, Sun L, Liu Z, Zhang S, Wang B, Su D, Su Z. 2011. *Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury*. Neurosci 176:162–172.
- Matyszak MK, Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. *Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens*. J Neuroimmunol 40:173–181.
- Matyszak MK, Perry VH. 1996. *The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system*. Neuroscience 74:599–608.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. 2005. *Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis*. Nat Med 11:335–339.
- McMenamin PG. 1999. *Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations*. J Comp Neurol 405:553–562.
- McMenamin PG, Wealhall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B. 2003. *Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy*. Cell Tissue Res 313:259–269.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Bruck W, Priller J, Prinz M. 2007. *Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions*. Nat Neurosci 10:1544–1553.
- Murphy KM. 2013. *Transcriptional control of dendritic cell development*. Adv Immunol 120:239–267.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. Science 308:1314–1318.
- Pashenkov M, Teleshova N, Link H. 2003. *Inflammation in the central nervous system: The role for dendritic cells*. Brain Pathol 13:23–33.
- Piva L, Tetlak P, Claser C, Karjalainen K, Renia L, Ruedl C. 2012. *Cutting edge: Clec9A+ dendritic cells mediate the development of experimental cerebral malaria*. J Immunol 189:1128–1132.
- Pooley JL, Heath WR, Shortman K. 2001. *Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells*. J Immunol 166:5327–5330.
- Poulin LF, Reyat Y, Uronen-Hansson H, Schraml BU, Sancho D, Murphy KM, Hakansson UK, Moita LF, Agace WW Bonnet D., Reis e Sousa. 2012. *DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues*. Blood 119:6052–6062.
- Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, Nye E, Le Moine A, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerundolo V Bonnet D., Reis e Sousa. 2010. *Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med 207:1261–1271.
- Prinz M, Tay TL, Wolf Y, Jung S. 2014. *Microglia: unique and common features with other tissue macrophages*. Acta Neuropathol 128:319–331.
- Probst HC, Tschannen K, Odermatt B, Schwendener R, Zinkernagel RM, van den Broek M. 2005. *Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells*. Clin Exp Immunol 141:398–404.
- Prodinger C, Bunse J, Kruger M, Schiefenhevel F, Brandt C, Laman JD, Greter M, Immig K, Heppner F, Becher B, Bechmann I. 2011. *CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system*. Acta Neuropathol 121:445–458.
- Punter U, Booth SG, Perry VH, Teeling JL. 2012. *Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia*. J Neuroinflammation 9:146.
- Ransohoff RM, Cardona AE. 2010. *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. Nature 468:253–262.
- Ransohoff RM, Engelhardt B. 2012. *The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system*. Nat Rev Immunol 12:623–635.
- Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernandez-Falcon P, Rosewell I., Reis e Sousa. 2009. *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity*. Nature 458:899–903.
- Sancho D, Mourao-Sa D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, Carlyle JR., Reis e Sousa. 2008. *Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin*. J Clin Invest 118:2098–2110.
- Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, Ostrowski MC, Himes SR, Hume DA. 2003. *A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse*. Blood 101:1155–1163.
- Schraml BU, van B, Zelenay S, Whitney PG, Filby A, Acton SE, Rogers NC, Moncaut N Carvajal JJ., Reis e Sousa. 2013. *Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage*. Cell 154:843–858.
- Schulz O., Reis e Sousa. 2002. *Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells*. Immunology 107:183–189.
- Serafini B, Columba-Cabezas S, Di RF, Aloisi F. 2000. *Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Am J Pathol 157:1991–2002.
- Serrano-Perez MC, Martin ED, Vaquero CF, Azcoitia I, Calvo S, Cano E, Tranque P. 2011. *Response of transcription factor NFATc3 to excitotoxic and traumatic brain insults: Identification of a subpopulation of reactive astrocytes*. Glia 59:94–107.
- Shechter R, London A, Schwartz M. 2013. *Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: Absolute barriers versus educational gates*. Nat Rev Immunol 13:206–218.
- Shortman K, Heath WR. 2010. *The CD8+ dendritic cell subset*. Immunol Rev 234:18–31.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K. 2007. *Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile*. Glia 55:412–424.
- van Rijt LS, Jung S, KleinJan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. 2005. *In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma*. J Exp Med 201:981–991.
- Watowich SS, Liu YJ. 2010. *Mechanisms regulating dendritic cell specification and development*. Immunol Rev 238:76–92.
- Zelenay S, Keller AM, Whitney PG, Schraml BU, Deddouche S, Rogers NC, Schulz O Sancho D., Reis e Sousa. 2012. *The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice*. J Clin Invest 122:1615–1627.